



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

TIAGO MANUEL FERNANDES MENDES

**Análise proteômica de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* e *Angiostrongylus cantonensis***

**Proteomic analysis of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and *Angiostrongylus cantonensis***

Campinas

2019

TIAGO MANUEL FERNANDES MENDES

Análise proteômica de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansonii* e *Angiostrongylus cantonensis*

Proteomic analysis of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansonii* and *Angiostrongylus cantonensis*

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, na Área de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia*

*Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Animal Biology, in the Concentration Area of Anthropic Relations, Environment and Parasitology*

Orientadora: SILMARA MARQUES ALLEGRETTI  
Coorientadora: FERNANDA JANKU CABRAL

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DE TESE DEFENDIDA  
PELO ALUNO TIAGO MANUEL  
FERNANDES MENDES, ORIENTADO PELA  
PROFA. DRA. SILMARA MARQUES  
ALLEGRETTI

Campinas

2019

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2016/07137-0; CAPES

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M522a Mendes, Tiago Manuel Fernandes, 1989-  
Análise proteômica de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* e *Angiostrongylus cantonensis* / Tiago Manuel Fernandes Mendes. –  
Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Silmara Marques Allegretti.  
Coorientador: Fernanda Janku Cabral.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de  
Biologia.

1. *Biomphalaria glabrata*. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. *Angiostrongylus cantonensis*. 4. Proteômica. 5. Metabolismo energético. I. Allegretti, Silmara Marques, 1963-. II. Cabral, Fernanda Janku, 1973-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Proteomic analysis of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and *Angiostrongylus cantonensis*

**Palavras-chave em inglês:**

*Biomphalaria glabrata*

*Schistosoma mansoni*

*Angiostrongylus cantonensis*

Proteomics

Energy metabolism

**Área de concentração:** Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

**Titulação:** Doutor em Biologia Animal

**Banca examinadora:**

Silmara Marques Allegretti [Orientador]

William de Castro Borges

Gerhard Wunderlich

Fernanda de Freitas Anibal

Marlene Tiduko Ueta

**Data de defesa:** 25-03-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Animal

Campinas, 25 de Março de 2015.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Profa Dra Silmara Marques Allegretti

Prof Dr William de Castro Borges

Prof Dr Gerhard Wunderlich

Profa Dra Fernanda de Freitas Anibal

Profa Dra Marlene Tiduko Ueta

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) (Código de Financiamento 001) pela bolsa de doutorado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Brasil (Fapesp) (nº do Proc.: 2016/07137-0) pelo financiamento deste projeto;

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Animal pela oportunidade de formação;

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silmara Marques Allegretti por todos os ensinamentos e amizade;

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Janku Cabral pela dedicação e todo o conhecimento transmitido;

Ao Prof Dr Emanuel Carrilho pela parceria que permitiu as análises proteômicas;

Aos membros da banca de análise prévia Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marlene Tiduko Ueta, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mara Cristina Pinto e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lizandra Magalhães por todas as correções e sugestões;

A todos os que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho;

À minha família e amigos (de ambos os lados do Oceano Atlântico) que me têm acompanhado por toda esta jornada;

A todos, na falta de melhores palavras, deixo o meu singelo OBRIGADO!

## Resumo

No Brasil, *Biomphalaria glabrata* é o principal hospedeiro intermediário responsável pela transmissão de *Schistosoma mansoni*. *Angiostrongylus cantonensis* é a principal causa de meningite eosinofílica humana, sendo também capaz de infectar *B. glabrata*. Considerando que ambos parasitas são capazes de infectar o mesmo hospedeiro invertebrado, o propósito deste trabalho foi caracterizar as alterações proteômicas, metabólicas e imunológicas em *Biomphalaria glabrata* 24h e 45 dias após a infecção (pi) por estes parasitas. Com este objetivo, foram extraídas proteínas de moluscos (24h pi) usando tampão Tris-Uréia que posteriormente foram digeridas com tripsina. Os espectros protéicos foram adquiridos utilizando um espectrômetro de massa Thermo LTQ Orbitrap Velos e analisados com auxílio dos *softwares* MaxQuant e Perseus. A hemolinfa dos caramujos foi coletada 24 h e 45 dias após a infecção, os hemócitos foram contados em câmara de Neubauer e os níveis de uréia, ácido úrico, óxido nítrico (NO), cálcio, glicogênio e atividade de aspartato e alanina aminotransferases (AST e ALT, respetivamente) foram medidos. Os caramujos também foram dissecados e os níveis de glicogênio da região cefalopodal e do complexo gonodal – glândula digestiva foram quantificados. Durante a infecção por *A. cantonensis* observamos um aumento significativo dos hemócitos e granulócitos e também observamos um aumento na expressão de proteínas de hemoglobina tipo 2. Proteínas hemoglobina tipo 1 e 2, globina-like e com domínio globina foram encontradas com expressão aumentada 1.024 a 5,588 vezes em moluscos infectados com *S. mansoni*, além disso, o número de hemócitos circulantes foi significativamente maior 24 h pi comparando com o grupo controle. No entanto não foi encontrada diferença significativa no número de hemócitos circulantes na hemolinfa 45 dias pi. Níveis de NO se encontravam mais elevados em todos os caramujos infectados (24 h e 45 dias pi). Diversas proteínas associadas com vias relacionadas ao metabolismo energético apresentaram expressão aumentada durante a infecção por ambos os parasitas sendo também detectada uma redução na concentração de glicogênio na região cefalopodal e principalmente no complexo gonodal – glândula digestiva. Em caramujos infectados com *S. mansoni*, foram encontradas diversas proteínas de potencial imune com expressão aumentada (como actina citoplasmática), contudo também encontramos proteínas imunes com expressão diminuída, como a biomphalisina, sugerindo que o parasita, de alguma forma, é capaz de modular a resposta imune de *B. glabrata*. Em caramujos infectados com *A. cantonensis*, diversas proteínas estruturais (como a cadeia pesada de miosina dos músculos estriados) tiveram expressão alterada, sugerindo perda de tecido. Em ambas as situações de infecção pelos parasitas, foi encontrada expressão aumentada da proteína LOC106059779 com domínio ADAM/reprolisina, cujo aumento de expressão pode ser, em parte, o que permite a mobilização do parasita pelos tecidos e o sucesso de infecção.

Palavras chave: *Biomphalaria glabrata*; *Schistosoma mansoni*; *Angiostrongylus cantonensis*; proteômica, metabolismo

## Abstract

In Brazil, *Biomphalaria glabrata* is the main intermediate host, responsible *Schistosoma mansoni* transmission. *Angiostrongylus cantonensis* is the main cause of human eosinophilic meningitis. Both parasites are capable of infecting *B. glabrata*. Understanding what happens inside the snail during infection would aid the development of better control strategies, therefore, our purpose was to characterize proteomic, metabolic and immunologic changes in *Biomphalaria glabrata* 24 h and 45 days after infection. For this purpose, proteins were extracted from snails (24 h after infection) with Tris-Urea buffer and digested with trypsin. Protein spectrums were obtained using a Thermo LTQ Orbitrap Velos and analyzed with MaxQuant and Perseus softwares. The hemolymph of five snails 24 h and 45 days after infection was collected, the number of hemocytes was counted in a Neubauer chamber and the levels of urea, uric acid, nitric oxide (NO), calcium, glycogen and alanine and aspartate aminotransferases (ALT and AST, respectively) activities were assessed. The snails were also dissected and both the cephalopodal region and gonada-digestive gland complex glycogen content was measured. After infection with *A. cantonensis*, we observed a significant increase of hemocytes and granulocytes as well as an increase in haemoglobin type 2 proteins. Haemoglobin Type 1 and 2 and globin-like proteins were found upregulated in *S. mansoni* infected snail, also the number of circulating hemocytes was significantly higher after 24 hours of infection when compared with the uninfected control group, however no significant difference was found after 45 days, suggesting that hemocytes migrated to the infection place. NO levels (produced by hemocytes to fight infections) were higher both 24 h and 45 days after infection with both parasites. Several proteins related with energy pathways were found upregulated in all infected snails, also, glycogen analysis, showed a significant decrease in the glycogen content, particularly in the gonad-digestive gland complex, which led to an increase in gluconeogenesis (characterized by an increase in urea and in AST and ALT activity). In *S. mansoni* infected snails, we found several upregulated proteins, that seem to be associated with immune response (such as cytoplasmic-like actin or gelsolin-like 2), however, some were also downregulated, such as biomphalysin suggesting that the parasite, somehow, is able to modulate the snails immune response. In *A. cantonensis* infected snails, we found several proteins with structural function (such as myosin heavy chain – striated muscle – like and uncharacterized protein LOC106059779) which were differentially expressed, suggesting loss/damage of internal tissues, either caused by the parasite to migrate easier or as a consequence of the migration through the tissues. In both infection situations uncharacterized protein LOC106059779, with a peptidase M12B, ADAM/reprolisin domain, was found up regulated, this increase in expression may be, partially, what allows the parasites mobilization through the host tissues and the success of infection.

**Key words:** *Biomphalaria glabrata*; *Schistosoma mansoni*; *Angiostrongylus cantonensis*; proteomic; metabolism

## Sumário

Introdução .....	12
1. <i>Schistosoma mansoni</i> .....	12
2. <i>Angiostrongylus cantonensis</i> .....	15
3. Interações parasita-hospedeiro intermediário .....	17
3.1 Hemócitos .....	17
3.2 Espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico .....	18
3.3. Imunoglobulinas com domínio lectina variável .....	19
3.3.1. FREPs .....	19
3.3.2. GREPs .....	19
3.4. Biomphalisina .....	20
3.5. Proteínas <i>heat-shock</i> .....	20
3.6. Região Gênica – Complexo de Resistência Guadalupe .....	21
1. Objetivo Geral .....	23
2. Objetivos Específicos .....	23
Capítulo I - Análise da Biologia Reprodutiva e Quantificação da Infecção de <i>Biomphalaria glabrata</i> por <i>Schistosoma mansoni</i> e/ou <i>Angiostrongylus cantonensis</i> .....	24
Resumo .....	24
Abstract .....	24
1. Introdução .....	25
2. Material e Métodos .....	26
2.1. Parasitas e Animais .....	26
2.2. Infecção dos grupos experimentais .....	27
2.3. Análise da biologia reprodutiva dos grupos experimentais .....	27
2.4. Quantificação da infecção .....	27
2.5. Análise estatística .....	27
3. Resultados .....	28
3.1. Análise da Biologia reprodutiva .....	28
3.2. Quantificação da infecção .....	29
4. Discussão .....	30
5. Conclusão .....	31
6. Referências .....	31
Capítulo II - Alterações Metabólicas em <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada com <i>Schistosoma mansoni</i> .....	33
Resumo .....	33
Abstract .....	33



1. Introdução.....	34
2. Materiais e Métodos .....	36
2.1. Parasitas e animais .....	36
2.2. Infecção dos caramujos .....	36
2.3. Análise Proteômica .....	37
2.3.1. Preparo dos extratos protéicos e digestão em solução por tripsina.....	37
2.3.2. Espectometria de Massa.....	37
2.3.3. Análise proteômica .....	38
2.4. Análise da hemolinfa.....	38
2.4.1. Contagem de hemócitos .....	38
2.4.2. Óxido Nítrico .....	39
2.4.3. Ácido Úrico.....	39
2.4.4. Uréia.....	39
2.4.5. Atividade das aminotransferases .....	39
2.4.6. Concentração de glicogênio.....	40
2.4.7. Concentração de cálcio .....	40
2.5. Quantificação de glicogênio nos tecidos .....	40
2.6. Análise estatística.....	41
3. Resultados.....	41
3.1. Análise proteômica.....	41
3.2. Ontologia Gênica (Gene Ontology – GO).....	47
3.3. Análise hemolinfa .....	53
3.4. Conteúdo de glicogênio nos tecidos.....	56
4. Discussão .....	56
5. Conclusão .....	61
6. Referências .....	61
Capítulo III – Alterações Metabólicas em <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> .....	67
Resumo .....	67
Abstract.....	68
1. Introdução.....	68
2. Materiais e Métodos .....	69
2.1. Parasitas e animais .....	69
2.2. Infecção dos caramujos .....	69
2.3. Análise Proteômica .....	70

2.3.1.	Preparo dos extratos proteicos e digestão em solução por tripsina.....	70
2.3.2.	Espectrometria de Massa .....	70
2.3.3.	Análise proteômica .....	70
2.4.	Análise da hemolinfa.....	71
2.4.1.	Contagem de hemócitos .....	71
2.4.2.	Óxido Nítrico .....	72
2.4.3.	Ácido Úrico.....	72
2.4.4.	Uréia.....	72
2.4.5.	Atividade das aminotransferases .....	73
2.4.6.	Concentração de glicogênio.....	73
2.4.7.	Concentração de cálcio .....	73
2.5.	Quantificação de glicogênio nos tecidos .....	74
2.6.	Análise estatística.....	74
3.	Resultados.....	74
3.1.	Análise proteômica.....	74
3.2.	Ontologia Gênica (Gene Ontology – GO).....	76
3.3.	Análise hemolinfa .....	82
3.4.	Conteúdo de glicogênio nos tecidos.....	84
4.	Discussão .....	84
5.	Conclusão .....	87
6.	Referências .....	88
Capítulo IV – Análise metabólica de <i>Biomphalaria glabrata</i> coinfectada com <i>Schistosoma mansoni</i> e <i>Angiostrongylus cantonensis</i> .....		94
Resumo .....		94
Abstract.....		94
1.	Introdução .....	95
2.	Material e Métodos .....	95
2.1.	Parasitas e Animais .....	96
2.2.	Infecção dos grupos experimentais e coleta de hemolinfa.....	96
2.3.	Análise da hemolinfa.....	97
2.3.1.	Contagem de hemócitos .....	97
2.3.2.	Óxido Nítrico .....	97
2.3.3.	Ácido Úrico.....	97
2.3.4.	Uréia.....	98
2.3.5.	Atividade das aminotransferases .....	98

2.3.6.	Concentração de glicogênio .....	99
2.3.7.	Concentração de cálcio .....	99
2.4.	Quantificação de glicogênio nos tecidos .....	99
3.	Resultados.....	100
3.1.	Contagem de hemócitos .....	100
3.2.	Medida dos níveis de óxido nítrico na hemolinfa .....	101
3.3.	Determinação dos níveis de ácido úrico.....	102
3.4.	Concentração de uréia na hemolinfa .....	103
3.5.	Determinação da atividade de aminotransferases .....	103
3.6.	Determinação dos níveis de cálcio na hemolinfa .....	104
3.7.	Concentração de glicogênio .....	105
4.	Discussão .....	106
5.	Conclusão .....	108
6.	Referências .....	108
	Discussão e Conclusões Gerais .....	111
	Referências Gerais.....	114
	Anexo 1 – Certificado CEUA.....	122
	Anexo 2 – Certificado curso de experimentação animal .....	123
	Anexo 3 – Declaração de direitos Autorais .....	124

## Introdução

Invertebrados do filo Mollusca, particularmente Gastropoda, são hospedeiros intermediários para o desenvolvimento larval de milhares de espécies de trematódeos com importância médica e/ou veterinária (Esch et al., 2002). Parasitas digenéticos adultos, como *Schistosoma*, *Echinostoma* e *Fasciola*, são conhecidos pelo efeito patológico no hospedeiro vertebrado e tem sido feito um esforço considerável para prevenir a infecção e morbidade destes parasitas. Atualmente, a relação entre esses parasitas e o seu hospedeiro intermediário é pouco conhecida, embora o seu conhecimento possibilite o desenvolvimento de melhores estratégias de controle da infecção intramolusco, resultando num melhor controle da doença em humanos (Giannelli et al., 2016).

A transmissão de *Schistosoma mansoni* no Brasil ocorre devido a caramujos do gênero *Biomphalaria*, sendo três espécies consideradas principais hospedeiras naturais: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* (Paraense, 2001). Espécies de *Biomphalaria* são capazes de manter a auto-integridade, principalmente por meio da atividade de seu sistema imune constituído por hemócitos e proteínas (Loker et al., 2004). Durante a infecção por *S. mansoni*, o sistema imune da *Biomphalaria* é capaz de reconhecer moléculas do parasita para ativar as células fagocíticas, que podem levar ao encapsulamento e destruição do parasita (Bayne et al., 2001).

Infecções parasitárias concomitantes interferem com o sistema imune do molusco, assim sendo a coinfeção de moluscos por espécies de helmintos pode ser uma ferramenta útil no melhor entendimento do mecanismo de destruição do parasita.

*Angiostrongylus cantonensis* é um nematódeo pertencente à superfamília Metastrongyloidea capaz de completar o desenvolvimento larval em *B. glabrata* (Barcante et al., 2003). A infecção por *A. cantonensis* em *B. glabrata* induz um aumento no número de hemócitos na tentativa de encapsulamento das larvas. Neste caso a infecção pelo parasito estimularia o sistema imune do molusco sem interferir diretamente com a sobrevivência de *S. mansoni* (Pereira et al., 2006).

### 1. *Schistosoma mansoni*

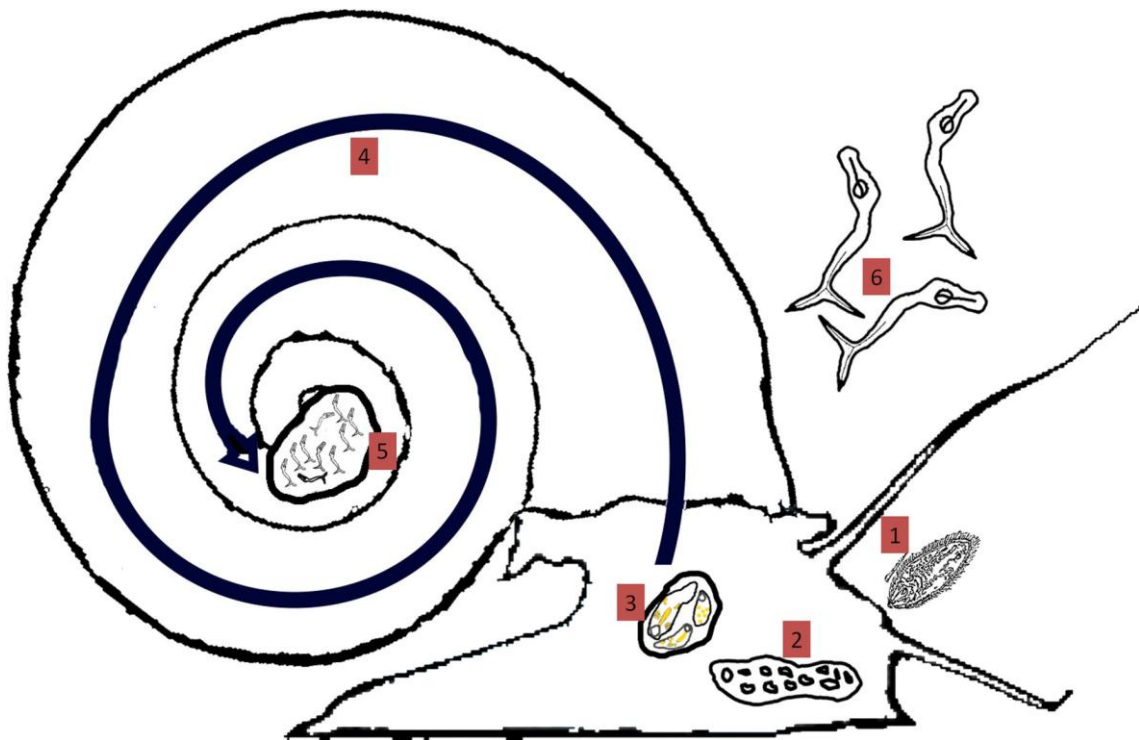
A esquistossomose é causada por parasitas do gênero *Schistosoma* entre os quais, *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum* são as espécies responsáveis pela maioria dos

infectados no mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 249 milhões de pessoas estejam infectadas por parasitas do gênero *Schistosoma* a uma escala mundial, e 732 milhões em risco de infecção, no entanto a falha de diagnóstico leva a que os números de casos sejam subestimados, sendo sugerido que o número real de pessoas infectadas esteja entre os 391 e 587 milhões, com perdas anuais de entre 1.7 e 4.5 milhões de anos vida ajustados por incapacidade (*Disability Adjusted Life Years - DALYs*) (WHO, 2014).

No ciclo de vida de *S. mansoni*, os ovos são liberados para o ambiente através das fezes. Na presença de água doce a larva ciliada (miracídio) eclode do ovo, nadando de forma ativa, guiado pela luz e por estímulos químicos, para encontrar e penetrar um molusco (hospedeiro intermediário) onde se desenvolverá, passando por diversos estágios de desenvolvimento até à formação de cercárias. As cercárias emergem do molusco como uma forma aquática de vida livre, adaptada à invasão do hospedeiro definitivo (Reimert et al., 2008; Thetiot-Laurent et al., 2013). No sistema porta hepático ocorre maturação em vermes adultos e acasalamento. Os casais emparelhados migram para as veias mesentéricas intestinais onde ocorre oviposição (Hagen et al., 2015). É estimado que 50% dos ovos atravessem o lúmen do intestino sendo excretados pelas fezes e que os outros 50% entrem na circulação sanguínea sendo retidos no fígado, pulmões e outros tecidos (Reimert et al., 2008; Thetiot-Laurent et al., 2013). Na esquistossomose a principal causa de patologia são os ovos acumulados nos tecidos, dando origem a inflamações eosinófilas e reações granulomatosas que resultam na formação do granuloma e formação de tecido fibroso ao redor das vênulas portais, podendo resultar em hepatoesplenomegalia, hipertensão portal e formação de varizes intestinais e esofágicas, que quando rompem podem causar hematemese fatal (Reimert et al., 2008).

Durante a fase intramolusco, o miracídio penetra o caramujo com auxílio de glândulas de adesão e de penetração. Após penetrar o molusco o parasita perde as glândulas de adesão e de penetração, assim como o epitélio ciliado em um período de 24 a 48 h após a infecção passando a ser designado como esporocisto primário (24 a 48 horas após a infecção). Inicialmente o miracídio apresenta movimentos amebóides que vão diminuindo até à total imobilização da larva. No seu interior, as células germinativas iniciam um processo de intensa multiplicação, levando a que o esporocisto primário dobre de tamanho. Aglomerados de células germinativas no interior do esporocisto primário se reorganizam e originam septos, ficando o esporocisto primário dividido em 150 a 200 camadas, sendo cada camada ou septo designada como esporocisto secundário (14 dias após infecção). Em torno do 18º dia após a

infecção, os esporocistos secundários começam a migrar em direção ao hepatopâncreas após saída do esporocisto primário (18 dias após a infecção) onde sofrem alterações no seu conteúdo de células germinativas que se dispõe em forma de mórula com uma célula basófila no seu centro, mórula esta que leva à formação das cercárias (25 a 30 dias após a infecção) que posteriormente saem do esporocisto secundário e emergem do molusco 30 a 45 dias após a infecção (Coelho et al., 2008; Maldonado and Acosta Matienzo, 1947). Um único miracídio pode gerar 300 mil cercárias, todas do mesmo sexo, já definido na fase de miracídio (Coelho et al., 2008).



**Figura 1** – Ciclo intramolusco de *S. mansoni* – Após a penetração do miracídio(1), ocorre transformação em esporocisto primário (2) (24 a 48 horas após a infecção), havendo em seguida formação do esporocisto secundário (3) (aproximadamente 14 dias após infecção); o esporocisto migra em direção do tecido glandular (4) (aproximadamente 18 dias após a infecção) onde se formam as cercárias (5) (25 a 30 dias após a infecção) que saem do molusco (6) (30 a 45 dias após a infecção) em busca de um hospedeiro vertebrado.

Atualmente apenas um fármaco está disponível para tratamento da esquistossomose, praziquantel (PZQ), sendo eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma*

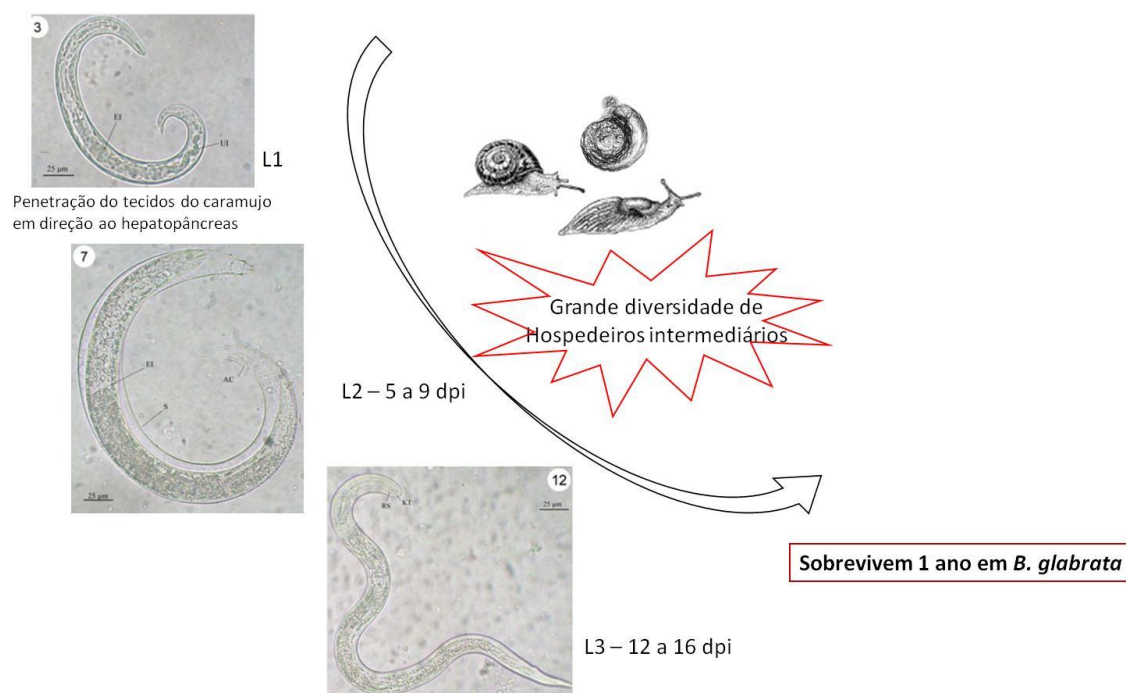
capazes de infectar seres humanos (Correa et al., 2019; Raso et al., 2004). Contudo, devido ao uso deste fármaco em campanhas de tratamento em massa tem levado ao surgimento de tolerância/resistência nas populações de parasitas (Botros and Bennett, 2007; Fallon and Doenhoff, 1994).

Além da problemática de surgimento de populações tolerantes/resistentes de parasitas, a aplicação de tratamento em massa como única estratégia de controle da doença, não tem mostrado ser a forma mais eficaz no controle desta parasitose. O controle da população de moluscos, principalmente quando associado ao tratamento da população humana doente e educação da população em saúde pública, tem apresentado os melhores resultados no controle da esquistossomose (Giannelli et al., 2016; Massara and Schall, 2004).

## **2. *Angiostrongylus cantonensis***

*A. cantonensis*, também conhecido como verme do pulmão de rato, é um parasita transmitido entre ratos e moluscos no ambiente natural (Sauerlander, 1976; Wang et al., 2012). No seu ciclo de vida, os parasitas adultos de *A. cantonensis* vivem nas artérias pulmonares dos ratos. As fêmeas depositam os ovos nas artérias pulmonares onde há eclosão da larva no primeiro estágio larvar. Após a eclosão, as larvas migram para a faringe, são deglutidas passam para as fezes e são excretadas. As larvas penetram ou são ingeridas pelo hospedeiro intermediário (lesmas/caramujos) (Figura 2), onde se desenvolverão até o terceiro estágio, no qual são infectantes para os hospedeiros mamíferos (Sauerlander, 1976). Quando o molusco é ingerido pelo hospedeiro definitivo, a larva (terceiro estágio L3) migra para o cérebro e desenvolve-se até à fase adulta, retornando para o sistema venoso e para as artérias pulmonares onde atinge a maturidade (Sauerlander, 1976; Wang et al., 2012). Durante a infecção do hospedeiro intermediário, a larva L1, após penetrar/ser ingerida pelo molusco, penetra os tecidos do hospedeiro até ao hepatopâncreas onde, 5 a 9 se desenvolve em larva de 2º estágio (L2), e 12 a 16 dias após a infecção sofre uma nova alteração morfológica passando a larva de terceiro estágio (L3), não se sabendo ao certo como ocorrem essas alterações. A larva L3 permanece no hospedeiro, reduzindo o seu metabolismo e entrando numa fase de pré-patência até à ingestão do molusco, estando relatada a sua viabilidade em *B. glabrata* por períodos de até um ano (Richards and Merritt, 1967).

Os humanos podem adquirir a infecção por ingestão dos hospedeiros intermediários (lesmas e caramujos) ou dos hospedeiros paratênicos (Peixes, crustáceos, platelmintos de vida livre, sapos e rãs) crus ou mal cozidos infectados com o parasita.(Espirito-Santo et al., 2013; Oehler et al., 2014). Nos humanos os vermes migram para o cérebro ou raramente para os pulmões, onde em geral, morrem (Wang et al., 2012).



**Figura 2** – Ciclo intramolusco de *A. cantonensis*. Após infecção, a larva L1 penetra os tecidos do caramujo em direção ao hepatopâncreas onde, 5 a 9 dias depois, passa ao estágio L2 e , em seguida (12 a 16 dias após infecção), ao estágio larva L3, permanecendo dentro do molusco até ingestão por um hospedeiro vertebrado (Fotos das larvas de Lv et al. (2009)).

A maioria dos casos humanos é diagnosticada no sudeste asiático e na bacia do Pacífico, mas o parasita também foi encontrado na Austrália, algumas áreas da África, no Caribe, Brasil e Estados Unidos, sendo a causa mais comum de meningite eosinofílica humana (Morassutti et al., 2013). O primeiro caso desta zoonose no Brasil foi reportado no município de Cariacica, no estado do Espírito Santo, sendo logo em seguida reportado nos municípios de Olinda e Escada (PE) e em São Paulo (SP). As infecções foram atribuídas à ingestão dos caramujos *Achatina fulica* e *Pomacea lineata*. Desde 2007, têm sido encontrados hospedeiros intermediários (moluscos terrestres e aquáticos entre os quais *B. glabrata*) e definitivos naturalmente infectados com *A. cantonensis*, em municípios de norte a sul do



Brasil, sendo o aumento do número de casos um problema de saúde pública devido a esta ampla distribuição (Morassutti et al., 2014; Thiengo et al., 2013).

A doença é manifestada normalmente por cefaléias fortes, rigidez da nuca e parestesias. Paralisia facial transitória ocorre em 5% dos infectados e também podem ocorrer febres baixas (Espírito-Santo et al., 2013). A maioria dos sintomas estão associados à migração da larva pelo sistema nervoso central e pela reação inflamatória provocada pela morte da larva que causa um aumento na pressão intracraniana (Prasidthrathsint et al., 2017).

Atualmente nenhum fármaco é eficaz no tratamento de infecções por *A. cantonensis* sendo apenas possível tratar a sintomatologia pelo uso de analgésicos, corticosteróides, e pela remoção cuidadosa do líquido em intervalos frequentes para redução da pressão intracraniana (Espírito-Santo et al., 2013; Wang et al., 2012), aumentando a importância de medidas de controle de moluscos.

### **3. Interações parasita-hospedeiro intermediário**

Os moluscos têm uma capacidade impressionante de se protegerem contra infecções por potenciais patógenos (Bayne, 2009; Ottaviani, 1992). A visão geral era que estes não possuíam imunidade adaptativa, sendo o sistema imune inato e não adaptativo. O reconhecimento de parasitas pelos invertebrados pensava-se ser com base em receptores *Toll-like* (TLR) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos. Contudo, este paradigma mudou com a descoberta de diversas sequências de receptores imunes, sugerindo a existência de polimorfismos, individuais ou populacionais, que permitem a sua sobrevivência quando confrontados com parasitas (Bayne, 2009; Roger et al., 2008).

*B. glabrata* utiliza receptores de reconhecimento de padrões para detectar patógenos e regular a resposta imune, incluindo diversos TLR em conjunto com uma rede de sinalização para regulação transcricional através de fatores de transcrição nuclear kappa B (NF-kB) (Adema et al., 2017). Outros receptores incluem proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (*peptidoglycan recognition-binding proteins* - PGRPs) e proteínas de ligação Gram-negativas (*Gram-negative binding protein* - GNBP) (Adema et al., 2017).

#### **3.1 Hemócitos**

Estudos da imunologia do caramujo, juntamente com o conhecimento de regulação e expressão gênica são essenciais para entender as interações entre helmintos e o seu hospedeiro intermediário (Giannelli et al., 2016). O sistema de defesa interno do caramujo

inclui duas populações de células efectoras de hemócitos, os granulócitos (atividade fagocitária) e os hialinócitos, assim como uma diversidade de fatores solúveis na hemolinfa (ex. imunoglobulinas com domínio lectina variável) que estão envolvidos no reconhecimento de patógenos e na resposta anti-inflamatória (Coustau et al., 2015; Giannelli et al., 2016).

Na infecção por *S. mansoni*, os hemócitos de *B. glabrata* coordenam a resposta imune, participando diretamente na morte do parasita por encapsulamento e eliminação da infecção, sendo a proliferação e diferenciação de hemócitos influenciada por fatores endógenos (Pila et al., 2016). Quando um patógeno encontra o hemócito no corpo do molusco, opsoninas o marcam, enzimas plasmáticas alteram a sua superfície química e receptores *non-self* na superfície da célula sinalizam quinases e fosfatases para ativar ou desativar enzimas intracelulares e fatores de transcrição, levando a modulação da transcrição gênica e à secreção de enzimas plasmáticas específicas alterando o comportamento celular (migração, fagocitose ou encapsulamento e degranulação) (Bayne, 2009). Pila et al. (2016) identificaram a granulina de *B. glabrata* (BgGNR), demonstrando a capacidade de induzir proliferação de hemócitos, em particular de uma população de hemócitos aderentes, indução esta que permitiu que caramujos sensíveis resistissem à infecção por *S. mansoni*.

### 3.2 Espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico

Após o reconhecimento do parasita, diferentes vias moleculares são ativadas, como por exemplo, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de óxido nítrico (NO), que são gerados pelos hemócitos de *B. glabrata* para exercer citotoxicidade mediada por células (Adema et al., 2017).

Hemócitos aderentes são altamente fagocitários, produzindo intermediários reativos de nitrogênio e fatores imunes solúveis importantes para a remoção de trematódeos digenéticos (Wu et al., 2017). Compostos altamente reativos derivados de oxigênio molecular, ou seja, ROS, principalmente  $H_2O_2$ , são cruciais para o caramujo se defender do *S. mansoni*, que está adaptado para se desenvolver em sistemas oxidativos (Mitta et al., 2017; Wu et al., 2017). Estudos prévios demonstraram que a expressão alélica específica de Cu-Zn superóxido dismutase (SOD), enzima catalizadora envolvida na produção de  $H_2O_2$ , estão ligadas com o fenótipo de resistência de *B. glabrata* a *S. mansoni* (Wu et al., 2017). Outro estudo publicado por Mone et al. (2011) demonstrou que existe uma correlação entre a alta produção de ROS de uma população de moluscos e a alta capacidade antioxidante do seu parasita simpátrico. Nota-se que neste estudo verificou-se que *S. mansoni* com capacidade altamente antioxidante

(Brasil) tem maior tendência para desenvolver infecção em combinação alopátrica, enquanto parasitas de Guadalupe (com menor capacidade antioxidante) mostraram ser incompatíveis com *B. glabrata* do Brasil.

### 3.3. Imunoglobulinas com domínio lectina variável

No caramujo, entre as proteínas plasmáticas com potencial imune, o maior grupo com atividade conhecida contra o esporocisto de *S. mansoni*, pertence à família de Imunoglobulina Variável de Domínio Lectina (*Variable Immunoglobulin and Lectin domain* – VIgL). Esta família possui três principais grupos (Wu et al., 2017): Proteínas relacionadas ao fibrinogênio (*fibrinogen-related proteins* – FREPs), proteínas relacionadas a galectina (*galectin-related proteins* – GREPs) e lectinas do tipo C (*C-type lectin-related proteins* – CREPs) (Adema et al., 2017; Wu et al., 2017)

#### 3.3.1. FREPs

FREPs são uma das categorias de VIgL mais estudadas, sendo somaticamente mutadas para gerar reportórios de FREPs únicos nos caramujos (Adema et al., 2017). Genes que codificam FREPs também foram mostrados em outros gastrópodes como *Aplysia californica* e *Littorina littorea* (Wu et al., 2017). O grande interesse por FREPs por parte da comunidade científica se deve à sua estrutura altamente conservada em diversos organismos, além de ser a única família de proteínas conhecida em gastrópodes que combina domínios de superfamílias de imunoglobulinas com o domínio fibrinogênio (Giannelli et al., 2016).

Entre as subfamílias de FREPs conhecidas, algumas atuam como opsoninas para vários monossacarídeos e antígenos de mucinas expressos nas superfícies de estágios larvais de *Schistosoma* (Galinier et al., 2017; Giannelli et al., 2016). Um estudo recente por Galinier et al., (Galinier et al., 2017) sugere que FREPs são determinantes moleculares na compatibilidade entre *B. glabrata* e *S. mansoni* estando intimamente relacionadas com as glicoproteínas tipo mucinas (SmPoMuc) do parasita, contudo o processo de compatibilidade é complexo e com vários outros receptores envolvidos.

#### 3.3.2. GREPs

Outra família de VIgL que parece estar implicada na resposta de *B. glabrata* a *S. mansoni* são as GREPs, estas proteínas mostraram ser capazes de se ligar aos estágios larvais de *S. mansoni*. O papel destas proteínas na resposta imune pode ser grande, visto que em um trabalho publicado por Wu et al. (2017) elas foram encontradas em 100% dos extratos de *B.*

*glabrata* resistente, no entanto os transcritos de GREPs foram encontrados em apenas 40 % dos extratos de caramujos sensíveis. Considerando que a taxa de infecção obtida pelos autores é de 80 %, é possível que a expressão de GREPs na linhagem sensível esteja relacionada a um fenótipo de resistência residual. Vale ressaltar que os autores acharam pequenas, mas consistentes diferenças entre os GREPs das duas linhagens após o sequenciamento, sugerindo a existência de polimorfismos, podendo assim as GREPs estar relacionadas com a compatibilidade de *B. glabrata* e *S. mansoni*.

### 3.4. Biomphalisina

As citolisinas de *Biomphalaria*, biomphalisina, têm sido levantadas como tendo um papel crucial na resposta imune de *B. glabrata* contra *S. mansoni* (Giannelli et al., 2016) mostrando ter alta toxicidade contra os esporocistos de *S. mansoni* (Galinier et al., 2017; Mitta et al., 2017). Uma caracterização funcional mostrou que biomphalisina pertence à superfamília de toxinas  $\beta$  formadoras de poros ( $\beta$  pore-forming toxin –  $\beta$ -PFT), que inclui fatores de virulência de amebas que ativam a lise formando canais nas membranas das células alvo. Biomphalisinas são especificamente expressas nos hemócitos, não mostrando expressão diferencial após exposição a *S. mansoni*, contudo possui atividade lítica, ligando-se à membrana do parasita exercendo alta citotoxicidade contra o esporocisto (Mitta et al., 2017).

### 3.5. Proteínas *heat-shock*

O papel das proteínas de estresse, *heat-shock* (HSP) tem sido estudadas na resposta imune de *B. glabrata*, sendo conhecidas cinco famílias destas proteínas em *B. glabrata*: HSP20, HSP40, HSP60, HSP70 e HSP90. Entre estas, a família de genes HSP70 é a maior com 6 genes com vários éxons, 5 genes com um éxon e mais de 10 pseudogenes (Adema et al., 2017). A ligação de HSP70 com a matriz larval de *S. mansoni* foi relatada recentemente por Wu et al. (2017), no entanto, embora HSP70 aumente a sua expressão na infecção por *Schistosoma*, em um estudo publicado por Arican-Goktas et al. (2014) observou-se que uma resposta ao estresse por expressão de HSP70 torna a infecção mais permissiva sendo mesmo a resposta controlada por mecanismos epigenéticos de regulação transcricional do gene pelo parasita. Neste estudo verificou-se que caramujos resistentes não expressavam HSP70, contrariamente a caramujos sensíveis e verificou-se ainda que exposição de caramujos resistentes a temperaturas elevadas para estímulo da produção de HSPs os tornava suscetíveis a *Schistosoma*, enquanto que ao bloquear HSP90 em caramujos sensíveis os tornavam mais resistentes à infecção. Embora seja aparente existir uma correlação entre HSPs

e *Schistosoma*, a ligação funcional (causa e efeito) ainda não foi estabelecida, sendo que mais estudos ainda são necessários (Adema et al., 2017).

### 3.6. Região Gênica – Complexo de Resistência Guadalupe

O Complexo de Resistência Guadalupe (GRC), uma região gênica em *B. glabrata*, que parece influenciar a capacidade de *B. glabrata* de Guadalupe de resistir à infecção por *S. mansoni* tem sido alvo de estudo. Três haplótipos distintos desta região foram encontrados e designados *R* (alelo dominante que confere resistência) e *S1* e *S2* (alelos recessivos que se mostraram equivalentes na sensibilidade).

A região GRC contém diversos genes com estrutura similar àqueles que codificam proteínas de reconhecimento de patógenos e TLRs (Allan et al., 2017; Tennessen et al., 2015b). No trabalho publicado por Allan et al. (2017) que analisa a funcionalidade de um dos genes GRC, o gene *grctm6*, mostrou que este *locus* é um candidato à resistência, demonstrando ainda que o *knockdown* de *Grctm6* por *short-interference* DNA (SiRNA) aumenta o número de cercárias eliminadas por caramujos. Contudo, é importante salientar que em um estudo por Tennessen et al. (2015a) utilizando *B. glabrata* resistente (isolada de uma linhagem de Salvador, Brasil), não foi encontrada relação entre o *locus* GRC e a suscetibilidade ao parasita, sugerindo que a influência deste complexo ainda tem de ser melhor entendida.

A interação entre *A. cantonensis* e *B. glabrata* ainda é desconhecida, se sabendo pouco de como o caramujo responde em função da infecção por este nematódeo. Embora exista um maior número de trabalhos procurando entender a interação entre *Biomphalaria* spp e *S. mansoni*, também não se tem uma visão completa de como o caramujo responde à infecção, assim como não existe uma compreensão de quais os fatores que permitem, ou não, a infecção do hospedeiro intermediário.

## **Justificativa**

A compreensão das proteínas que são relevantes para o sucesso no estabelecimento do parasito e o fracasso no controle efetivo por parte do hospedeiro intermediário, poderá não só permitir o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para a redução de *S. mansoni* e de *A. cantonensis*, mas também de outras parasitoses que requerem moluscos como seus hospedeiros intermediários.

## Objetivos

### 1. Objetivo Geral

O objetivo do projeto consiste em caracterizar o proteoma de *Biomphalaria glabrata* durante a infecção por *S. mansoni* e *A. cantonensis*, em infecções simples e em coinfecção, para identificação de proteínas envolvidas na compatibilidade parasita – hospedeiro intermediário.

### 2. Objetivos Específicos

Os parasitas pertencentes ao gênero *Angiostrongylus* sp. não apresentam especificidade para o hospedeiro intermediário infectando várias espécies de hospedeiros intermediários ao contrário do *S. mansoni* que apresenta especificidade de gênero para o hospedeiro intermediário, sendo a *Biomphalaria* sp o hospedeiro intermediário de *S. mansoni* no Brasil. Com base nessas informações, são estabelecidos como objetivos específicos:

- 1 – Avaliar a biologia reprodutiva e determinar a infecção de *B. glabrata* infectada com *S. mansoni*, *A. cantonensis* ou em coinfecção.
- 2 – Avaliar o perfil protéico, metabólico e imunológico de *B. glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni*
- 3 – Avaliar o perfil protéico, metabólico e imunológico de *B. glabrata* infectada por *Angiostrongylus cantonensis*
- 4 – Avaliar o perfil metabólico e imunológico de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* e *A. cantonensis*

## **Capítulo I - Análise da Biologia Reprodutiva e Quantificação da Infecção de *Biomphalaria glabrata* por *Schistosoma mansoni* e/ou *Angiostrongylus cantonensis***

### **Resumo**

*Schistosoma mansoni* tem grande especificidade para o seu hospedeiro intermediário, infectando caramujos do gênero *Biomphalaria*. *Angiostrongylus cantonensis* não tem especificidade para o hospedeiro intermediário. Uma vez que ambos parasitas são capazes de infectar o mesmo hospedeiro invertebrado, o nosso objetivo foi avaliar alterações na reprodução dos caramujos quando infectados com um e ambos parasitas e quantificar e avaliar o sucesso de infecção. Foram formados quatro grupos: Grupo I – *Biomphalaria glabrata* infectada com *S. mansoni*; Grupo II – *B. glabrata* infectada com *A. cantonensis*; Grupo III – *B. glabrata* coinfectada com *S. mansoni* e *A. cantonensis*; Grupo IV – *B. glabrata* não infectada (grupo controle). Semanalmente, o número de posturas e ovos foram contados, isolados e o número de eclosões determinado para cálculo da viabilidade. Após 45 dias de infecção, foi contado o número de cercárias e larvas nos diferentes grupos. Nos grupos I e III houve uma redução significativa no número de posturas por caramujo comparando com o grupo controle, no entanto o número total de ovos no grupo I e também no grupo II foi superior comparativamente ao grupo controle, enquanto no grupo III o número de ovos foi significativamente menor. Não foi encontrada diferença na viabilidade dos ovos. O número de cercárias e de larvas foi significativamente menor em caramujos coinfectados. Os resultados sugerem que durante a infecção por *A. cantonensis* ocorre um estímulo reprodutivo, levando a um maior número de posturas e ovos por caramujo, no entanto, durante a coinfecção, ocorre uma diminuição de reprodução, esta diminuição, associada com a diminuição de número de cercárias e larvas L3 de *A. cantonensis* de parasitas pode indicar uma competição por nutrientes no caramujo, levando a estes decréscimos.

Palavras chave: *Biomphalaria glabrata*; *Schistosoma mansoni*; *Angiostrongylus cantonensis*; reprodução, coinfecção

### **Abstract**

*Schistosoma mansoni* has a very high specificity for its intermediate host, infecting snails of the *Biomphalaria* genus. *Angiostrongylus cantonensis* doesn't show specificity for its intermediate host. Since both parasites are capable of infecting the same intermediary host, our purpose was to assess if there were changes in the snails ability to reproduce, when infected with only one or both parasites and differences in parasite load and infection success. Four groups of *B. glabrata* snails were used: group I: infected with *S. mansoni*; group II: infected with *A. cantonensis*; Group III: coinfecting with *S. mansoni* and *A. cantonensis*; Group IV: Uninfected. Weekly, the number of eggs and egg masses were counted, isolated and the number of eggs hatching was counted to determine viability. 45 dpi the number of *S. mansoni* cercariae and *A. cantonensis* larvae was recorded. Group I and



Group III had a significant reduction in total number of egg masses compared with the uninfected control group, however the total number of eggs from group I, as well as group II was significantly bigger when compared with the control group, while in group III the total number of eggs was inferior to the control group suggesting that infection with *S. mansoni* stimulates *B. glabrata* snail to reproduce more, however coinfection with *A. cantonensis* reduced the total number of eggs laid. No difference in egg viability was found in the infected groups compared with the uninfected group. Both the number of *S. mansoni* cercariae and *A. cantonensis* larvae were significantly lower in the coinfecting group when compared with the groups infected with only one parasite suggesting that both parasites compete for the same nutrients therefore reducing the mollusk parasite load.

Key words: *Biomphalaria glabrata*; *Schistosoma mansoni*; *Angiostrongylus cantonensis*; Reproduction, coinfection

## 1. Introdução

*Schistosoma mansoni* é um parasita estenoxeno em relação ao hospedeiro intermediário, infectando caramujos do gênero *Biomphalaria* (Giannelli et al., 2016). *A. cantonensis*, é eurixeno infectando diversos moluscos terrestres e aquáticos entre os quais caramujos do gênero *Biomphalaria* (Guerino et al., 2009; Pereira et al., 2006; Thiengo et al., 2013).

Após a infecção há ativação da resposta imune do molusco na tentativa de eliminar a infecção (Bayne et al., 2001). Esta resposta leva a um aumento do consumo de energia e consequentemente pode levar a uma diminuição da capacidade do caramujo se reproduzir pelo déficit energético (Faro et al., 2013). Além disso, alguns autores demonstraram que a infecção por *S. mansoni* pode levar a uma castração de *B. glabrata* (Alberto-Silva et al., 2015; Faro et al., 2013).

Como referido anteriormente, *A. cantonensis* tem a capacidade de infectar e se desenvolver em *B. glabrata*, contudo a relação entre o parasita e o caramujo ainda não é bem conhecida (Guerino et al., 2009).

A possibilidade de infecção do mesmo hospedeiro intermediário por duas espécies distintas de parasita, levanta questões importantes, por exemplo a presença de um parasita debilita ainda mais o caramujo facilitando a infecção por outro patógeno ou se a estimulação do sistema imune auxilia no combate à infecção, ou ainda se ocorre competição por nutrientes (Coustau et al., 2015; Guerino et al., 2009).

Com o intuito de entender melhor a relação entre parasito – hospedeiro intermediário durante a infecção com *S. mansoni* e/ou *A. cantonensis*, é objetivo do presente estudo analisar a biologia reprodutiva de *B. glabrata* em situação de infecção simples e conjunta.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Parasitas e Animais**

Neste trabalho foi utilizada a linhagem BH (Belo Horizonte) de *S. mansoni* e parasitas *A. cantonensis*, ambos parasitas mantidos há mais de 15 anos pelo Grupo de Helmintologia – Departamento de Biologia Animal da Universidade de Campinas.

Para manutenção do ciclo de vida de *S. mansoni* foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem Swiss como hospedeiro vertebrado e caramujos *B. glabrata* de Belo Horizonte. Fezes de camundongos infectados com pelo menos 60 dias de infecção foram coletadas, homogeneizadas em água gelada e filtradas por uma peneira com malha de 0,150 mm. A eclosão dos miracídios foi estimulada por exposição dos ovos a luz incandescente. Os miracídios foram coletados e utilizados para a infecção dos hospedeiros intermediários. Os caramujos foram expostos individualmente a 8 miracídios por 8 horas. Após 45 dias os moluscos foram expostos a luz incandescente por 1 h para estímulo da liberação de cercárias. As cercárias foram coletadas e utilizadas para a infecção individual de camundongos pela técnica de imersão da cauda em água contendo 70 cercárias expostos a luz incandescente 2 horas (Olivier and Stirewalt, 1952) .

Para manutenção do ciclo de vida de *A. cantonensis*, foram utilizados ratos (*Ratus norvegicus*) fêmeas linhagem Wistar como hospedeiro vertebrado e caramujos *B. glabrata* de Belo Horizonte como hospedeiro intermediário. Fezes de ratos infectados (com pelo menos 55 dias de infecção) foram coletadas, maceradas e colocadas em uma peneira com gaze. A peneira foi colocada em contato com água a 42°C num cálice de sedimentação e expostas a luz incandescente por 4 h. O sedimento foi recolhido, observado em microscópio estereoscópico e as larvas L1 foram isoladas para infecção do caramujo. Os moluscos foram expostos individualmente a 50 larvas L1 de *A. cantonensis* em água deionizada por 16 h. Após 45 dias os caramujos infectados foram retirados das conchas, macerados, submersos em solução de pepsina ( 4 g de pepsina solubilizada em 1L de 230,4 mM de HCl) e digeridos a

37°C por 2 h. As larvas L3 foram observadas em microscópio estereoscópico e isoladas para infecção de ratos de 30 dias de idade. Cada rato foi infectado com 20 larvas por gavagem.

O protocolo deste estudo (n° 4024-1) foi aprovado pelo comitê de ética para experimentação animal (CEEAA) do Instituto de Biologia da Unicamp, e realizado de acordo com os princípios éticos adotados pela Associação Brasileira de Experimentação Animal (COBEA).

## **2.2. Infecção dos grupos experimentais**

Para a infecção foram utilizadas 50 larvas (L1) de *A. cantonensis* obtidas como descrito anteriormente. Foram selecionados caramujos com aproximadamente 8 mm de diâmetro, expostos individualmente às larvas durante 16 h, em seguida expostos individualmente a 8 miracídeos de *Schistosoma mansoni* (BH) por 8 h. Foram definidos quatro grupos, Grupo I: *B. glabrata* infectada com *S. mansoni*; Grupo II: *B. glabrata* infectada com *A. cantonensis*; Grupo III: *B. glabrata* coinfectada com *S. mansoni* e *A. cantonensis* e Grupo IV: *B. glabrata* não infectada. Foram infectados 50 caramujos por grupo (n=50) e cada grupo mantido em dois aquários de vidro com água decolorada com 25 moluscos cada. A água dos aquários foi trocada semanalmente e os caramujos foram alimentados com alface duas vezes por semana.

## **2.3. Análise da biologia reprodutiva dos grupos experimentais**

Semanalmente o número de posturas e o número de ovos foram quantificados ao microscópio estereoscópico. Após cada contagem as posturas foram isoladas e acondicionadas em placas de petri para contagem do número de moluscos eclodidos e determinação da viabilidade. A viabilidade dos ovos, expressa em porcentagem (Guerino et al., 2009).

## **2.4. Quantificação da infecção**

Aos 45 dias após a infecção, os moluscos foram colocados em frascos individuais contendo 5 mL de água decolorada e expostos a luz incandescente para estimulação de eliminação de cercárias de *S. mansoni*. O número de cercárias foi contado, sendo em seguida realizada a digestão de cada molusco com pepsina para recuperar larvas L3 de *A. cantonensis* e contadas por molusco (Guerino et al., 2009; Pereira et al., 2006).

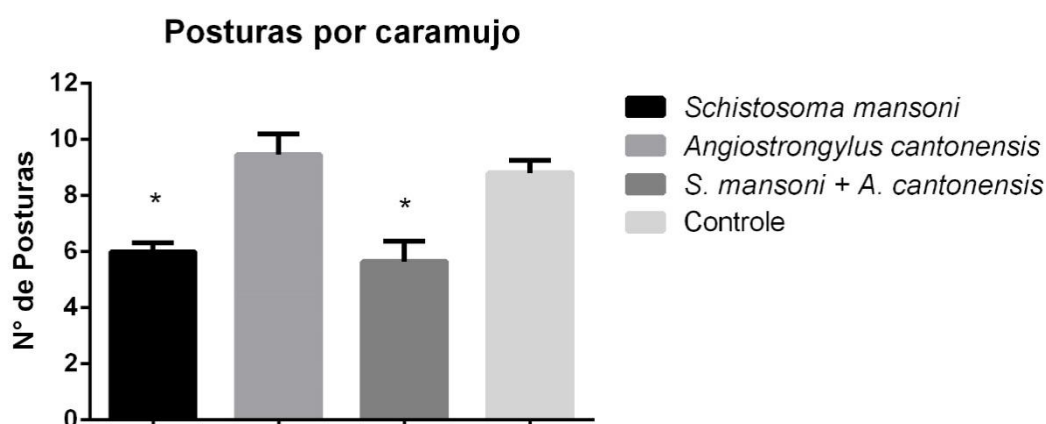
## **2.5. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o *software* GraphPad Prism. Análise de Variância (ANOVA) foi utilizada para identificar a presença de diferenças estatisticamente significativas entre grupos, onde  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

### 3. Resultados

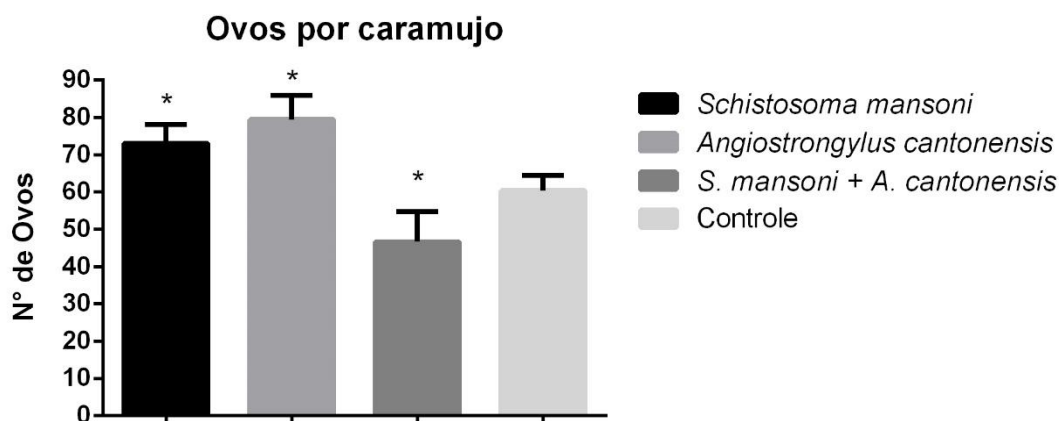
#### 3.1. Análise da Biologia reprodutiva

Foi possível observar que caramujos infectados com *S. mansoni* tanto na situação de infecção simples como em coinfecção colocaram menor número de posturas do que caramujos não infectados, sendo esta redução no número de posturas estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Caramujos infectados unicamente por *A. cantonensis* não mostraram diferenças significativas no número de posturas quando comparadas ao grupo controle (Figura 1).



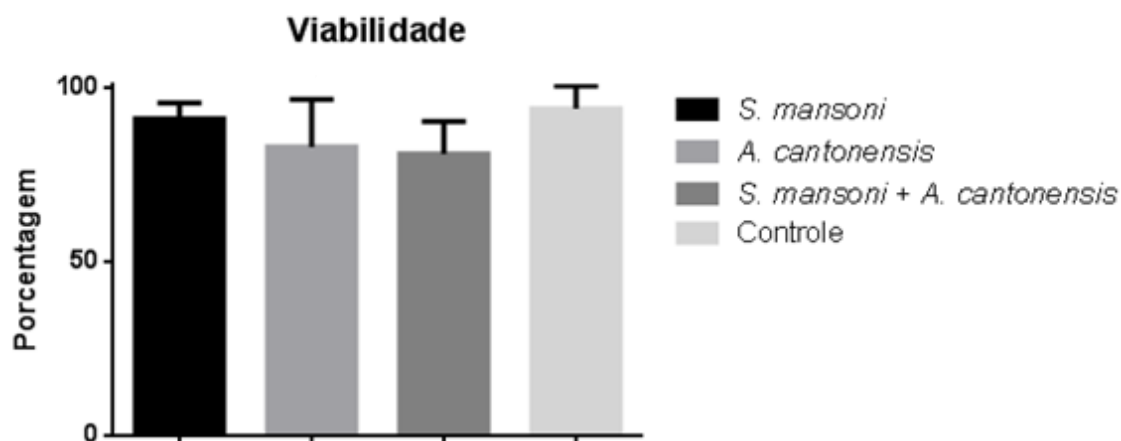
**Figura 1** – Número médio de posturas realizada por cada molusco nos diferentes grupos experimentais (n=50). \*Possui diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle não infectado (*One-way* ANOVA,  $p < 0,05$ ).

O número de ovos por caramujo foi estatisticamente diferente em todos os grupos ( $p < 0,05$ ). Em caramujos na situação de infecção simples, o número de ovos por caramujo foi superior ao do grupo controle. No grupo coinfectado por *S. mansoni* e *A. cantonensis*, o número de ovos por caramujo foi inferior ao do grupo controle (Figura 2).



**Figura 2** – Número médio de ovos colocado por cada molusco nos diferentes grupos experimentais (n=50). \*Possui diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle não infectado (*One-way ANOVA*,  $p<0,05$ ).

A análise estatística indicou que a viabilidade dos ovos não teve diferença estatisticamente significativa em todos os grupos infectados, quando comparados ao controle (Figura 3).



**Figura 3** – Viabilidade dos ovos (%) de cada grupo experimental (n=50 caramujos). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (*One-way ANOVA*,  $p<0,05$ ).

### 3.2. Quantificação da infecção

A percentagem de moluscos que eliminaram cercárias 45 dias após a infecção foi de 85.7% e 90.5% para moluscos infectados com *S. mansoni* em infecção simples e coinfetados com *S. mansoni* e *A. cantonensis*, respectivamente. O número de cercárias eliminado foi significativamente maior ( $p<0.05$ ) no caso de infecção simples ( $3840\pm1050$ ) do

que na coinfecção ( $2350 \pm 901$ ). *A. cantonensis* infectou 100% dos caramujos dos dois grupos, no entanto o número de larvas foi significativamente maior ( $p < 0.05$ ) no grupo infectado apenas com *A. cantonensis* ( $11,8 \pm 1,47$ ) do que no grupo coinfectado com *S. mansoni* ( $5,6 \pm 0,8$ ). Os resultados estão representados na tabela 1.

**Tabela 1** – Número médio e desvio padrão (SD) de cercárias de *S. mansoni* eliminadas por cada grupo experimental e número médio e SD de larvas de *A. cantonensis* recuperadas.  
<sup>a</sup>Possuem diferença significativa entre o grupo infectado apenas com um parasita e com o grupo coinfectado (*One-way ANOVA*,  $p < 0,05$ ).

	Cercárias de <i>S. mansoni</i>			Larvas de <i>A. cantonensis</i>		
	Percentagem de moluscos positivos	Nº de cercárias	SD	Percentagem de moluscos positivos	Nº de larvas	SD
<b>Infecção <i>S. mansoni</i></b>	85,7	<b>3840<sup>a</sup></b>	1050,5	-	-	-
<b>Infecção <i>A. cantonensis</i></b>	-	-	-	100	<b>11,8<sup>a</sup></b>	1,47
<b>Infecção <i>S. mansoni</i> + <i>A. cantonensis</i></b>	90,5	<b>2350<sup>a</sup></b>	901,4	100	<b>5,6<sup>a</sup></b>	0,8

#### 4. Discussão

A redução significativa do número de posturas em caramujos infectados com *S. mansoni* (infecção simples ou coinfecção) está de acordo com os resultados observados por Alberto-Silva et al. (2015) e Faro et al. (2013) que também observaram uma redução significativa no número de posturas em *B. glabrata* infectada com *S. mansoni*, sendo mesmo observada castração de alguns moluscos. Contudo, é interessante observar que entre os caramujos infectados apenas com *S. mansoni* houve um aumento significativo do número de ovos por caramujo, provavelmente como resposta ao estresse induzido pela infecção. De acordo com Mello-Silva et al. (2007), para aumentar a eficiência de reprodução, o caramujo coloca um maior número de ovos por postura diminuindo perda de energia.

O aumento do número de ovos como resposta ao estresse pode também explicar o motivo do aumento significativo de ovos em *B. glabrata* infectada apenas por *A. cantonensis*. A infecção com o parasita não só estimulou o aumento de ovos, mas também não mostrou ter impacto significativo no número de posturas, sugerindo que, embora o parasita provoque algum estresse ao caramujo, o seu consumo energético é inferior ao de *S. mansoni*, podendo

essa diferença de consumo estar associada ao próprio parasita, uma vez que *S. mansoni* consome mais nutrientes do hospedeiro devido à formação de cercárias (fase multiplicativa), contrariamente a *A. cantonensis* que não tem fase multiplicativa no molusco e, após atingir o estágio L3 reduz o seu metabolismo entrando em um período de pré patência (Coelho et al., 2008; Richards and Merritt, 1967). Quando em situação de coinfecção, existe uma diminuição significativa de posturas e ovos, pelo impacto do consumo energético dos dois parasitas. Além disso, a diminuição significativa de cercárias e larvas recuperadas nos grupos coinfectados em relação aos grupos com infecção por apenas um parasita, leva a crer que os parasitas parecem que competem entre si pelos nutrientes do hospedeiro intermediário.

Um ponto interessante, foi a percentagem de caramujos infectados. Embora *S. mansoni* se tenha adaptado ao seu hospedeiro intermediário, exibindo uma grande especificidade, a percentagem de caramujos infectados com sucesso ficou entre 85,7 e 90,5%, no entanto, *A. cantonensis*, que tem capacidade de infectar diversos caramujos (terrestre ou aquáticos) (Coustau et al., 2015), não apresentando especificidade, foi capaz de infectar 100% dos caramujos, levantando a questão se o parasita simplesmente consegue se manter “invisível” do sistema imune do caramujo ou se existem outros fatores que permitem que ele o combata.

## 5. Conclusão

*S. mansoni* provoca alterações na capacidade do caramujo se reproduzir, diminuindo o número de posturas por caramujo e obrigando o mesmo a utilizar estratégias como o aumento de número de ovos por postura diminuindo o consumo energético. *A. cantonensis* parece provocar menos alterações no caramujo, não afetando o número de posturas, no entanto ainda assim, provocando um aumento no número de ovos. Por fim a coinfecção por ambos parasitas, levou a uma diminuição significativa na capacidade de reprodução de *B. glabrata*, provavelmente devido à competição entre os parasitas por nutrientes, levando também à diminuição do número de parasitas.

## 6. Referências

Alberto-Silva, A.C., Santos, E.G.N., Santos, C.P., Mello-Silva, C.C., 2015. Changes in the locomotory and reproductive behavior of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *Experimental parasitology* 153, 68-74.

- Bayne, C.J., Hahn, U.K., Bender, R.C., 2001. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. *Parasitology* 123 Suppl, S159-167.
- Coustau, C., Gourbal, B., Duval, D., Yoshino, T.P., Adema, C.M., Mitta, G., 2015. Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade. *Fish & Shellfish Immunology* 46, 5-16.
- Faro, M.J., Perazzini, M., Correa Ldos, R., Mello-Silva, C.C., Pinheiro, J., Mota, E.M., de Souza, S., de Andrade, Z., Junior, A.M., 2013. Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. *Experimental parasitology* 134, 228-234.
- Giannelli, A., Cantacessi, C., Colella, V., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2016. Gastropod-Borne Helminths: A Look at the Snail-Parasite Interplay. *Trends in parasitology* 32, 255-264.
- Guerino, L.R., Linhares, A.X., Magalhaes, L.A., Zanotti-Magalhaes, E.M., 2009. Attraction of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 miracidia to *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) in the presence of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes, 1971 infection. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia* 69, 1101-1105.
- Mello-Silva, C.C., Vilar, M.M., Bezerra, J., Vasconcellos, M.C., Jairo, P., Rodrigues, M., 2007. Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata* exposed to *Euphorbia splendens* var. hislopii latex. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 671-674.
- Olivier, L., Stirewalt, M.A., 1952. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of parasitology* 38, 19-23.
- Pereira, C.A., Martins-Souza, R.L., Coelho, P.M., Lima, W.S., Negrao-Correa, D., 2006. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* susceptibility to *Schistosoma mansoni*. *Acta tropica* 98, 224-233.
- Thiengo, S.C., Simoes Rde, O., Fernandez, M.A., Maldonado, A., Jr., 2013. *Angiostrongylus cantonensis* and rat lungworm disease in Brazil. *Hawai'i journal of medicine & public health : a journal of Asia Pacific Medicine & Public Health* 72, 18-22.



## Capítulo II - Alterações Metabólicas em *Biomphalaria glabrata* infectada com *Schistosoma mansoni*

### Resumo

A esquistossomose mansônica é uma doença negligenciada transmitida por caramujos do gênero *Biomphalaria*. A interação entre o caramujo e o parasita é complexa e em grande parte desconhecida. Para melhor entender o que ocorre durante a infecção, neste trabalho caracterizamos as alterações proteômicas, metabólicas e imunológicas em *Biomphalaria glabrata* 24h e 45 dias após a infecção (pi). Com este objetivo, foram extraídas proteínas de moluscos (24h pi) usando tampão Tris-Uréia que posteriormente foram digeridas com tripsina. Os espectros de massa foram adquiridos utilizando um espectrômetro de massa Thermo LTQ Orbitrap Velos e analisados com auxílio dos *softwares* MaxQuant e Perseus. A hemolinfa dos caramujos foi coletada 24 h e 45 dias após a infecção, os hemócitos foram contados em câmara de Neubauer e os níveis de uréia, ácido úrico, óxido nítrico (NO), cálcio, glicogênio e atividade de aspartato e alanina aminotransferases (AST e ALT, respectivamente) foram medidos. Os caramujos também foram dissecados e os níveis de glicogênio da região cefalopodal e do complexo gonadal – glândula digestiva foram quantificados. Proteínas hemoglobina tipo 1 e 2 e globina-like foram encontradas com expressão aumentada em moluscos infectados, além disso, o número de hemócitos circulantes foi significativamente maior 24 h pi comparando com o grupo controle, no entanto não foi encontrada diferença significativa no número de hemócitos circulantes na hemolinfa 45 dias pi, sugerindo que os hemócitos migraram para o local de infecção, ainda, os níveis de NO (produzidos por hemócitos para combate de infecção) se encontravam mais elevados em caramujos 24 h e 45 dias pi. Diversas proteínas relacionadas com vias energéticas foram encontradas com expressão aumentada após a infecção. A concentração de glicogênio na região cefalopodal e no complexo gonadal – glândula digestiva também foi significativamente inferior comparando com caramujos não infectados. O decréscimo da concentração de cálcio na hemolinfa está possivelmente associado ao consumo pelo parasita, utilização como cofator em diversas vias metabólicas e com o depósito deste íon nos tecidos do caramujo em resposta às reações inflamatórias causadas pelo parasita. Em caramujos infectados, foram encontradas diversas proteínas de potencial imune com expressão aumentada (como actina citoplasmática ou gelsolina-like 2), contudo também encontramos proteínas imunes com expressão diminuída, como a biomphalisina, sugerindo que o parasita, de alguma forma, é capaz de modular a resposta imune de *B. glabrata*.

Palavras chave: *Biomphalaria glabrata*; *Schistosoma mansoni*; proteômica, metabolismo

### Abstract

Schistosomiasis is a neglected disease transmitted by *Biomphalaria* spp snails. Parasite – intermediate host interaction is complex and still not fully understood. To better understand what happens during infection, we characterized the proteomic, metabolic and immunologic changes in *Biomphalaria glabrata* 24 h and 45 days after infection with *Schistosoma mansoni*. For this purpose, proteins were extracted from snails (24 h after

infection) with Tris-Urea buffer and digested with trypsin. Peptide spectrums were obtained using a Thermo LTQ Orbitrap Velos and analyzed with MaxQuant and Perseus software. The hemolymph of five snails 24 h and 45 days after infection was collected, the number of hemocytes was counted in a Neubauer chamber and the levels of urea, uric acid, nitric oxide (NO), calcium, glycogen and alanine and aspartate aminotransferases (ALT and AST, respectively) activities were assessed. The snails were also dissected and both the cephalopodal region and gonoda-digestive gland complex glycogen content was measured. The haemoglobin Type 1 and 2 and globin-like proteins were found upregulated, also the number of circulating hemocytes was significantly higher after 24 hours of infection when compared with the uninfected control group, however no significant difference was found after 45 days, suggesting that hemocytes migrated to the infection place, furthermore, NO levels (produced by hemocytes to fight infections) were higher both 24 h and 45 days after infection. Several proteins related with energy pathways were found upregulated. Also, glycogen analysis, showed a significant decrease in the cephalopodal region and gonad-digestive gland complex glycogen content. The decrease in calcium levels is likely due to this ion being deposited in the hosts' tissues in response to inflammatory reactions caused by the parasite. Among several upregulated proteins, we found some that seem to be associated with immune response (such as Cytoplasmic-like actin or Gelsolin-like 2), however, some were also downregulated, such as biomphalysin suggesting that the parasite, somehow, is able to modulate the snails immune response.

Key words: *Biomphalaria glabrata*; *Schistosoma mansoni*; proteomics; metabolism

## 1. Introdução

A esquistossomose é uma doença parasitária que afeta mais de 200 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2016). No Brasil, esta doença é causada por *S. mansoni*, sendo *B. glabrata* o seu principal hospedeiro intermediário (Campos et al., 2002). Estudos imunológicos protéicos e da expressão gênica são essências para compreender as interações entre parasita e hospedeiro intermediário (Giannelli et al., 2016).

Para detectar e regular a resposta imune, *B. glabrata* utiliza receptores *toll-like* em conjunto com uma rede de sinalização para regulação transcricional através do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B (Adema et al., 2017). Outros receptores incluem proteínas de reconhecimento-ligação de peptidoglicanos (*Peptidoglycan Recognition-Binding Proteins* – PGRPs) e proteínas de ligação Gram-negativas (GNBP) (Adema et al., 2017). Após reconhecimento do patógeno, duas populações efetoras de hemócitos atuam no sistema de defesa imune do caramujo, os granulócitos (com atividade fagocítica) e os hialinócitos, assim como uma diversidade de fatores solúveis presentes na hemolinfa do molusco e que estão envolvidos no reconhecimento de patógenos e na resposta inflamatória (Coustau et al., 2015; Giannelli et al., 2016). Quando um patógeno é encontrado por um hemócito, ele é marcado

por opsoninas, enzimas plasmáticas alteram a sua superfície e receptores *non-self* na superfície da célula sinalizam quinases e fosfatases para ativar ou desativar enzimas intracelulares e fatores de transcrição, modulando a transcrição genética, produzindo enzimas plasmáticas específicas e alterando o comportamento celular (migração, fagocitose ou encapsulação) (Bayne, 2009).

Entre as proteínas plasmáticas descritas com potencial imune contra o esporocisto de *S. mansoni*, um dos principais grupos pertence à família de Imunoglobulina Variável e Domínio Lectina (*Variable Immunoglobulin and Lectin domain* – VIgL) (Wu et al., 2017). Dentro desta família as proteínas de domínio fibrinogênio (FREPS) são as mais estudadas, por sofrerem mutações somáticas gerando repertórios únicos nos caramujos atuando como opsoninas sobre diversas mucinas dos esporocistos de *Schistosoma* (Adema et al., 2017; Giannelli et al., 2016).

Outra proteína com importância na resposta imune são as citolisinas de *Biomphalaria*, biomphalisina, que têm mostrado alta toxicidade contra o esporocisto de *S. mansoni* (Galinier et al., 2017; Mitta et al., 2017).

Um grupo protéico que também tem sido bastante estudado, são as proteínas *Heat-Shock* (HSP). Wu et al. (2017) descreveram a ligação entre a proteína HSP70 e o tegumento do esporocisto de *S. mansoni*, contudo, em um estudo por Arican-Goktas et al. (2014) não somente o aumento da expressão desta proteína tornava a infecção mais permissiva, mas o próprio parasita mostrou ter capacidade de controlar epigeneticamente a expressão gênica do hospedeiro.

Os hemócitos de adesão têm uma grande importância no sistema imune do caramujo, sendo altamente fagocíticos e produzindo óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Adema et al., 2017; Wu et al., 2017), tendo sido demonstrado que o sucesso de infecção do parasita é dependente da sua capacidade de lidar com a produção de ROS pelo molusco (Mone et al., 2011).

Durante a infecção o parasita consome nutrientes presentes no hospedeiro e libera produtos de excreção/secreção provocando alterações metabólicas no caramujo, frequentemente aumentando as suas necessidades energéticas (Tunholi-Alves et al., 2012). Em situações de déficit energético, *B. glabrata* utiliza reservas de glicogênio presentes nas glândulas digestivas e região cefalopodal (Faro et al., 2013). Além disso, pode ocorrer um aumento da degradação de proteínas e aminoácidos para obtenção de esqueletos de carbono,

degradação esta, que pode ser indicada pela atividade das aminotransferases, enzimas estas que catalisam a transferência de grupos  $\alpha$ -amino entre aminoácidos que são depois encaminhados para a gluconeogênese (Mello-Silva et al., 2010; Pinheiro et al., 2001). A desaminação, e a degradação de nitrogênio, podem levar a alterações significativas nos níveis de ureia e ácido úrico na hemolinfa (Becker and Schmale, 1975; Souza et al., 2000; Tunholi-Alves et al., 2012).

Um íon de grande importância em *B. glabrata* é o cálcio, não só por ser um dos principais componentes da concha, mas também por ter um papel crucial no sistema imune e metabolismo do caramujo (Mostafa, 2007; Tunholi-Alves et al., 2014).

Compreender a interação parasita hospedeiro intermediário é crucial para o desenvolvimento de ferramentas para controle mais eficazes (Giannelli et al., 2016; Giovanelli et al., 2002). Assim sendo, este trabalho teve como objetivo avaliar alterações proteômicas, imunológicas e metabólicas de *B. glabrata* durante a infecção por *S. mansoni*.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Parasitas e animais**

Utilizou-se a linhagem BH (Belo Horizonte) de *S. mansoni*, mantida em *B. glabrata* no Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia - Unicamp, Brasil. Para manutenção do ciclo de vida, camundongos (*Mus musculus*) Swiss fêmeas com 30 dias, foram infectados individualmente por imersão da cauda em uma solução contendo 70 cercárias durante 2 h (Olivier and Stirewalt, 1952).

O protocolo deste estudo (n° 4024-1) foi aprovado pelo comitê de ética para experimentação animal (CEEa) do Instituto de Biologia da Unicamp, e realizado de acordo com os princípios éticos adotados pela Associação Brasileira de Experimentação Animal (COBEA).

### **2.2. Infecção dos caramujos**

Fezes de camundongos infectados foram coletadas, homogeneizadas em água gelada e filtradas por uma peneira com 0,150 mm de malha. Os ovos foram expostos a luz incandescente para estimular a eclosão dos miracídios. Após eclosão, os caramujos com aproximadamente 8 mm de diâmetro foram expostos individualmente a 8 miracídios durante 8

h. Os caramujos foram mantidos em aquários de vidro com água dechlorada, trocada semanalmente, e alimentados com alface duas vezes por semana.

## **2.3. Análise Proteômica**

### **2.3.1. Preparo dos extratos protéicos e digestão em solução por tripsina**

Considerando que o parasita se encontra nos tecidos do hospedeiro, e com o intuito de visualizar as alterações totais do caramujos, optamos por utilizar o tecido total de *B. glabrata*. O tecido total de 3 moluscos infectados com *S. mansoni* (24 h após infecção) e de 3 caramujos não infectados (n=3) foi homogeneizado individualmente em tampão Tris-Ureia (50mM Tris pH 8.1, 75mM NaCl e 8M Uréia), inibidores de proteases e fosfatases e posteriormente centrifugadas a 20.000 x g por 15 minutos a 4°C (Wu et al., 2014). O conteúdo protéico do sobrenadante foi quantificado pelo método de Pierce (Pierce BCA Protein Assay Kit -Thermo Scientific, Rockford, USA). Posteriormente 150 µg de proteínas foram precipitadas com acetona numa proporção 4:1 (vol:vol) incubadas a -20°C por 2 h e centrifugadas a 24000 g por 10 min a 4°C. As proteínas precipitadas foram dissolvidas em 20 µL de Ureia (8 M), o pH foi medido (entre 7 e 8), reduzidas com 5mM (concentração final) de Dithiothreitol (DTT) e incubadas a 56°C por 30 minutos. Após a redução, as amostras foram alquiladas por adição de 14 mM (contração final) de iodoacetamida (IAA) e incubadas no escuro a temperatura ambiente por 15 min. As amostras foram diluídas na proporção de 1:5 com 50 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, digeridas com tripsina (Promega) na proporção 1:50 (Enzima:Substrato) e incubadas a 37°C por 16 h. Realizada a digestão por tripsina as amostras foram dessalinizadas em colunas do tipo OASIS (Waters), evaporadas em *speed vac* e estocadas a -20°C até a análise por espectrometria de massas.

### **2.3.2. Espectrometria de Massa**

As amostras (50 µg) foram injetadas em uma pré-coluna Thermo EASY C18-A1, 2cm (L) x 100 µm (D.I) x 5 µm x 120 Å e separadas em uma coluna Thermo EASY C18-A2, 10cm (L) x 75 µm (D.I) x 3 µm x 120 Å. A aquisição de dados foi realizada utilizando um Thermo Easy n-LC II acoplado a um espectrômetro de massas Thermo LTQ Orbitrap Velos (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). A eluição foi realizada com água milli-Q (0,1% ácido fórmico, Sigma) (Fase A) e acetonitrila grau massas (0,1% ácido fórmico) adquiridos da Sigma-Aldrich (Fase B), com eluição no modo gradiente, com tempo total de aquisição de dados de 135 minutos, com fluxo de 0,2 µL/minuto. A espectrometria de massa foi realizada

no laboratório de Bioanalítica, Microfabricação e Separações – BioMics, do professor Dr. Emanuel Carrilho do Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo.

### 2.3.3. Análise proteômica

Espectros MS/MS (raw data) foram processados com o *software* MaxQuant utilizando Quantificação *Label Free* (LFQ) (Cox and Mann, 2008), quantificando os íons precursoros mais intensos. As buscas proteicas foram realizadas utilizando arquivos de formato fasta de 3 bases de dados de *B. glabrata* (NCBI - [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov); Uniprot – [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org); vectorbase – [www.vectorbase.org](http://www.vectorbase.org)). Para confiança na identificação peptídica, a tolerância de massa para os íons precursoros foi 4,5 ppm e 20 ppm para fragmentos de íons. Oxidação da metionina e N-acetilação foram escolhidas como modificações fixas e carbamidometil como modificação variável. Apenas peptídeos com 3 peptídeos únicos identificados foram considerados. O grupos protéicos resultantes foram analisados utilizando o *software* estatístico Perseus (versão 1.5.2.6) (Tyanova et al., 2016). Primeiramente foram aplicados filtros relacionados aos potenciais contaminantes, proteínas com identificação incorreta e identificação nas replicatas. A qualidade experimental dos espectros foi realizada utilizando as ferramentas *multi-scatter plots*, análise de componentes principais (PCA) e *hierarchical clustering*. Para analisar a expressão protéica de proteínas com  $p < 0.05$  e diferença de expressão de 0.5 (50%) entre grupos infectados e não infectados, aplicamos o teste estatístico *T-student*. Para análise de Gene Ontology (GO) (Função molecular, Componente celular e Processos biológicos) de proteínas diferencialmente expressas, utilizando as suas sequências, foi realizada uma busca manual na base de dados vectorbase para identificar os domínios/famílias das proteínas e respectivos GOs.

## 2.4. Análise da hemolinfa

A hemolinfa foi coletada 24 h e 45 dias após a infecção (pi). Cada parâmetro foi analisado utilizando a hemolinfa de 5 caramujos escolhidos de forma aleatória. As quantificações foram realizadas individualmente para cada caramujo e as medidas foram realizadas 2 vezes.

### 2.4.1. Contagem de hemócitos

A contagem de hemócitos foi realizada em câmara de Neubauer utilizando 10  $\mu$ L de hemolinfa diluída (1/10) em tampão CBSS (Chernin Balanced Salt Solution – 48 mM NaCl, 2,0 mM KCl, 0,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,8 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3,6 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,6 mM

NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 mM glucose e 3 mM threalose, pH 7,4) com 0.5% de vermelho neutro, onde hemócitos corados de vermelho foram considerados granulócitos (Martins-Souza et al., 2003).

#### **2.4.2. Óxido Nítrico**

O NO foi estimado de forma indireta através da medida dos níveis de nitrito pela reação de Griess. Resumidamente, uma solução contendo 10 µL de hemolinfa, 100 µL de reagente de Griess e 100 µL de ácido tricloroacético (10%) foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 3000 g por 5 minutos. O sobrenadante (200 µL) foi transferido para uma placa de 96 poços e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 600 nm. A quantidade de nitrito foi estimada contra curva padrão de NaNO<sub>2</sub> e expresso em nM (Pereira et al., 2006).

#### **2.4.3. Ácido Úrico**

Para determinar a concentração de ácido úrico, 4 µL de hemolinfa foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços, seguido da adição de 196 µL de reagente de coloração (Laborclin, Brasil – 50 mM de tampão fosfato, 200 U/L de uricase, 1000 U/L de peroxidase, 0,30 mM de 4-Aminofenazona e 4 mM de 2-amino-3.5 ácido diclorobenzoico). A solução foi homogeneizada e incubada a 37°C por 5 minutos. A leitura foi realizada a 490 nm em um espectrofotômetro. A quantidade de ácido úrico foi estimada contra uma curva padrão e expressos em µg/µL (Sanders et al., 1980).

#### **2.4.4. Uréia**

Para medir os níveis de ureia, 1 µL de hemolinfa foi misturado com 100 µL de tampão uréase (19,1 mM de tampão fosfato, 59,3 mM de salicilato de sódio, 3,2 mM de nitroprussido de sódio e 13,4 kU/L uréase - Labtest) e incubado a 37°C por 5 min. Após incubação, foram adicionados 100 µL de solução oxidante (2,7 M de hidróxido de sódio, 115 mM de hipoclorito de sódio) e incubados por mais 5 minutos a 37°C. As medidas foram realizadas a 600 nm em espectrofotômetro e a concentração estimada contra uma curva padrão de ureia, sendo os resultados expressos em µg/µL (Searcy et al., 1967).

#### **2.4.5. Atividade das aminotransferases**

Para testar a atividade das aminotransferases, 16,1 µL de substrato (solução contendo 0,2 M L-alanina ou 0,2 M L-aspartato; 0.002 M a-cetoglutarato e 0.1 M tampão sódio fosfato, pH 7.4) para ALT ou AST foram incubados a 37 °C durante 2 min, após a qual foram adicionados 6,5 µL de hemolinfa. A solução foi homogeneizada e incubada a 37°C

durante 30 min. Após incubação, foram adicionados 16,1  $\mu\text{L}$  de 0.001 M 2,4 dinitrofenilhidrazina e mantidos a 25 °C durante 20 min. A reação foi parada adicionando 161,3  $\mu\text{L}$  de 0,4 M NaOH. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 490 nm e os resultados expressos como U/mL (Tunholi-Alves et al., 2012).

#### **2.4.6. Concentração de glicogênio**

Para determinação da concentração de glicogênio, 13  $\mu\text{L}$  de hemolinfa foram homogeneizados em 53  $\mu\text{L}$  de fenol 5%, em seguida foram adicionados 133  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98%, incubado a temperatura ambiente por 10 minutos e seguido de incubação a 30°C por 20 min. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 490 nm, a concentração foi estimada contra uma curva padrão de glicogênio e os resultados expressos em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Lo et al., 1970).

#### **2.4.7. Concentração de cálcio**

A concentração de cálcio na hemolinfa foi medida com base no princípio de que a complexona O-cresolftalaina reage com cálcio em meio alcalino formando um complexo de cor púrpura (Chilcote and Wasson, 1958). Para isso 4  $\mu\text{L}$  de hemolinfa foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços sendo em seguida adicionada uma solução contendo 0,08 mM de complexona O-cresoftaleina e 4,5 mM de 8-hidroxiquilona. Após homogeneização, as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 minuto e medidas a 600 nm em espectrofotômetro. A concentração de cálcio foi estimada contra uma curva de  $\text{CaCO}_3$  e expressa em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

### **2.5. Quantificação de glicogênio nos tecidos**

A região cefalopodal e o complexo gonodal - glândula digestiva foram dissecados de 5 caramujos selecionados de forma aleatória 24 h e 45 pi. Também foram dissecados 5 caramujos não infectados como grupo controle. A dissecação foi realizada em gelo para evitar metabolização de carboidratos por ação enzimática. A extração foi realizada pelo método de Pinheiro et al. (2001), onde os tecidos foram pesados e homogeneizados em ácido tricloroacético (10%) (10 mL por grama de tecido) e centrifugados a 2000 g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em papel Whatman n°1, etanol gelado foi adicionado na



proporção 2:1 seguido de incubação em gelo por 15 minutos e centrifugado a 2000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de HCl (1 M) para hidroxilação do glicogênio e incubado a 100 °C por 30 minutos. Para quantificação do glicogênio, o pH foi neutralizado com 1 M de NaOH, 33 µL de glicogênio extraído foram homogeneizados em 33 µL de fenol 5%, foi adicionado 133 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98%, incubado a temperatura ambiente por 10 minutos e novamente incubados a 30°C por 20 min. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 490 nm, a concentração foi estimada contra uma curva padrão de glicogênio e os resultados expressos em µg de glicogênio /mg de tecido húmido (wt) (Lo et al., 1970).

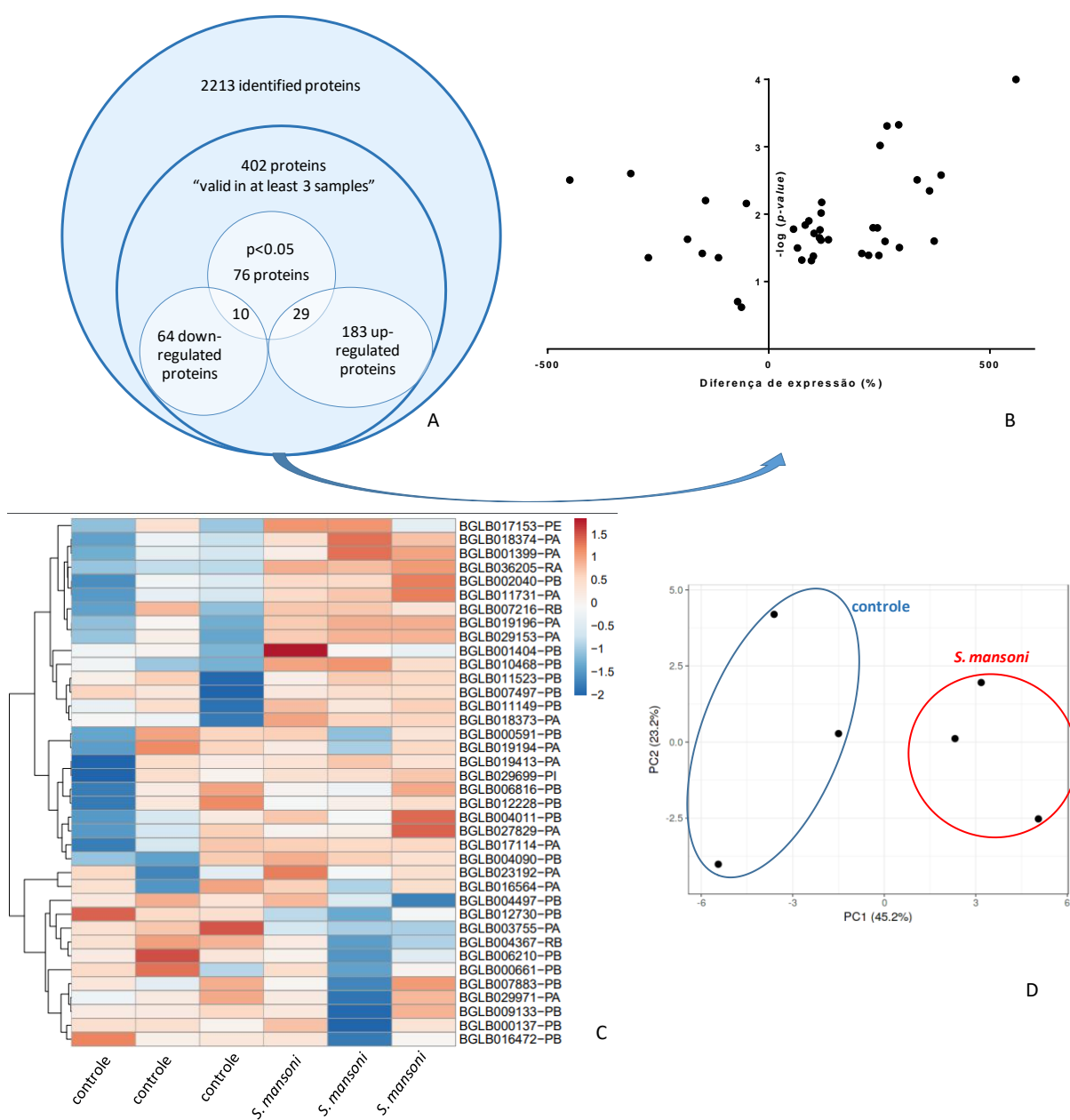
## **2.6. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o *software* GraphPad Prism. Análise de Variância (ANOVA) foi utilizada para identificar a presença de diferenças estatisticamente significativas entre grupos, onde  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## **3. Resultados**

### **3.1. Análise proteômica**

Utilizando o *software* MaxQuant e Perseus (Cox and Mann, 2008; Tyanova et al., 2016) total de 2213 proteínas foram identificadas, das quais 402 foram consideradas como “válidas em pelo menos 3 amostras de um grupo”. De 402 proteínas foram selecionadas as proteínas com *p-value* inferior a 0,05 (*T-student*) e cuja diferença de expressão fosse de 0.5 (50%) entre grupos, resultando em 29 proteínas com expressão aumentada (Tabela 1) e 10 proteínas com expressão diminuída (Tabela 2) (Figura 1).



**Figura 1** – Visão geral de peptídeos e proteínas identificadas neste estudo: (A) Diagrama de Venn (Microsoft®Powerpoint) das proteínas identificadas e quantificadas; (B) Representação gráfica das proteínas significativas e com expressão diferenciada (GraphPad Prism 7); (C) *Heatmap* das proteínas significativas e com expressão diferenciada (ClustVis); (D) Análise de componentes principais (PCA) (ClustVis).

**Tabela 1** – Proteínas com expressão aumentada em *B. glabrata* 24 h após a infecção por *S. mansoni*.

VectorBaseID	$-\log(p\text{-value})$	Diferença	Nome da Proteína	Peptídeos	Peptídios Únicos	Cobertura da sequência [%]	MW [kDa]	Score
BGLB019196-PA	1,796	2,456	Cadeia de colagenio alpha-5(VI)-like	16	13	547	42571	25911
BGLB011149-PB	1,616	1,179	Hemoglobina tipo 2	120	15	734	19675	32331
BGLB029153-PA	1,838	0,824	transgelina-3-like	18	18	873	18307	32331
BGLB036205-RA	2,347	3,632	Proteína não caracterizada LOC106059779	8	8	377	51342	32331
BGLB004011-PB	3,325	2,937	fosfoglicerato mutase	10	10	689	2859	67236
BGLB007883-PB	1,499	0,647	14-3-3 epsilon-like	14	14	578	29234	24555
BGLB007216-RB	1,312	0,962	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase -like	11	11	453	43516	10436
BGLB019413-PA	1,320	0,746	actina, citoplasmica-like	37	7	813	59597	32331
BGLB004367-RB	1,778	0,558	arginina kinase	39	22	915	39297	32331
BGLB003755-PA	2,176	1,197	ATP sintase subunidade beta, mitochondrial-like	22	20	631	56762	32331
BGLB002040-PB	1,596	2,629	histona H2A/H2B/H3/H4	3	3	185	14018	52527

BGLB001404-PB	1,798	2,358	endoglucanase A- <i>like</i>	11	10	345	50732	14455
BGLB001399-PA	1,902	0,907	endoglucanase E-4- <i>like</i>	22	12	418	95921	32331
BGLB027829-PA	1,378	1,009	gelsolina- <i>like</i> 2	9	9	287	39034	16168
BGLB018373-PA	1,715	1,024	globina- <i>like</i>	9	8	602	13461	19762
BGLB000591-PB	1,389	2,489	glucose desidrogenase [FAD, quinona]- <i>like</i>	14	14	456	53425	73732
BGLB012228-PB	1,390	2,256	Proteína ligante a guanina nucleotídica subunidade beta	9	9	434	37252	488
BGLB010468-PB	2,018	1,184	hemoglobina tipo 2	107	11	76	15837	32331
BGLB011731-PA	1,651	1,145	hemoglobina tipo 2	128	18	759	19675	32331
BGLB029971-PA	1,505	2,951	histona H3- <i>like</i>	3	3	232	11342	46947
BGLB019194-PA	1,621	1,348	Proteína não caracterizada LOC106051722	43	34	561	88413	32331
BGLB011523-PB	3,999	5,588	Proteína não caracterizada LOC106077292	16	8	89	22345	6341
BGLB006816-PB	3,310	2,672	Peptidase processadora mitocondrial- subunidade beta- <i>like</i>	9	9	399	44458	33764
BGLB000661-PB	3,020	2,515	miofilina- <i>like</i>	6	6	431	2299	47533
BGLB007497-	2,581	3,896	Cadeia essencial leve de miosina, músculo estriado	9	9	677	18228	48114

PB			adutor					
BGLB007064-PB	2,510	3,354	Fator de transformação do crescimento beta ig-h3- <i>like</i>	9	9	229	68859	19925
BGLB012730-PB	1,417	2,101	Proteína não caracterizada LOC106050211	26	11	516	61458	29496
BGLB017114-PA	1,602	3,737	Proteína não caracterizada LOC106051763	111	20	647	19212	32331
BGLB018374-PA	1,767	1,156	Proteína não caracterizada LOC106051916	92	73	761	13908	32331

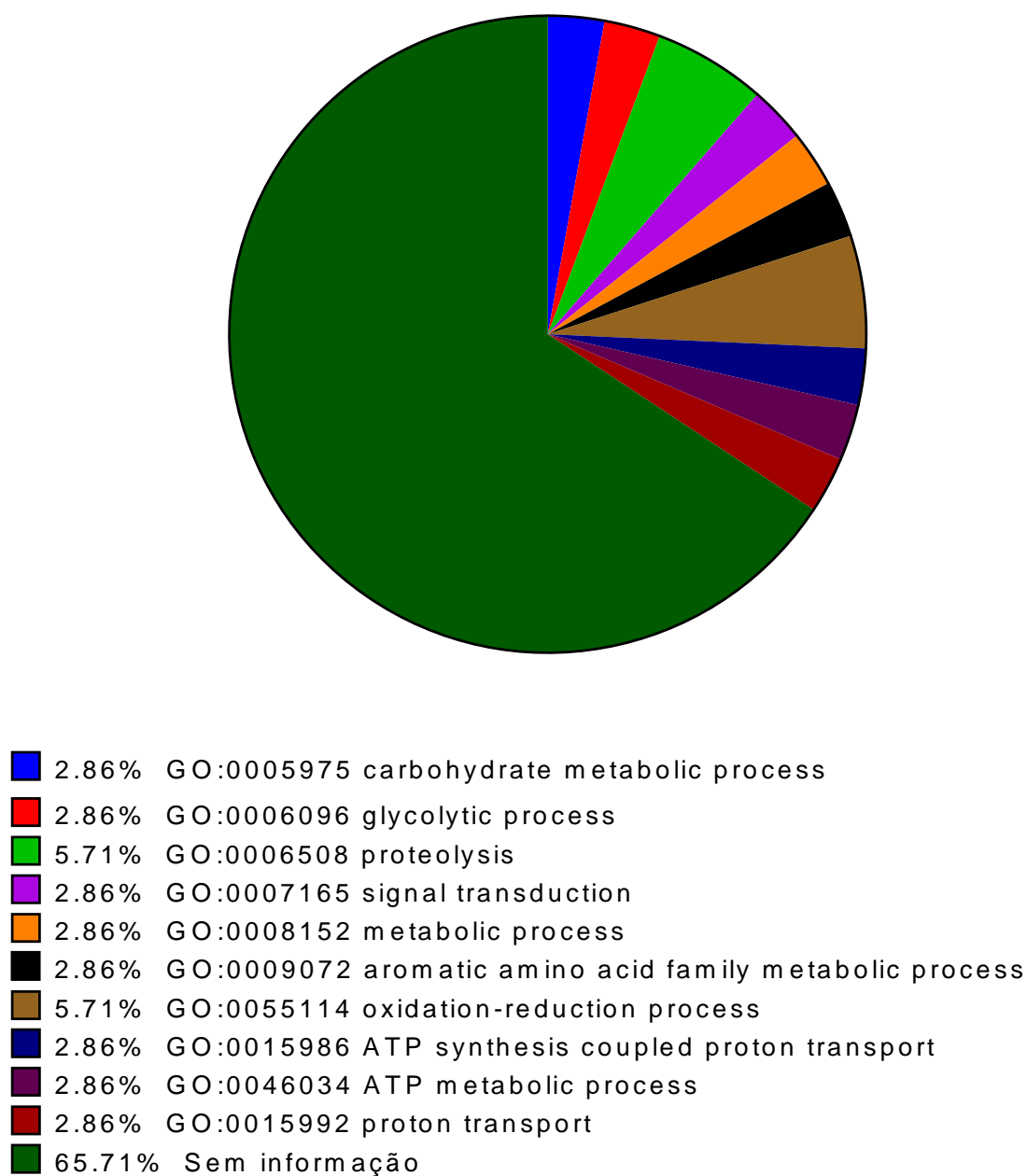
**Tabela 2** – Proteínas com expressão diminuída em *B. glabrata* 24 h após a infecção com *S. mansoni*

VectorBaseID	$-\log(p\text{-value})$	Diferença	Nome da Proteína	Peptídios	Peptídios Únicos	Cobertura da sequência [%]	MW [kDa]	Score
BGLB017153-PE	2,159	0,508	filamina-A-like isoforme X4	72	72	445	25687	3233 <sub>1</sub>
BGLB000137-PB	0,619	0,619	Biomphalisina	13	2	287	64808	1187 <sub>3</sub>
BGLB016472-PB	0,704	0,704	Proteína retrograde def 51 kDa isoforme X2	58	57	861	65281	3233 <sub>1</sub>
BGLB004090-PB	1,356	1,136	Ependimina 1 like	11	11	393	27251	1357 <sub>3</sub>
BGLB004497-PB	2,204	1,432	Fator de elongação 1-gamma-like	8	8	177	49142	5133 <sub>9</sub>
BGLB029699-PI	1,417	1,505	troponina I-like isoforme X10	26	3	51	41564	3233 <sub>1</sub>
BGLB009133-PB	1,628	1,838	SCO-spondin-like	5	5	38	23673	7882 <sub>2</sub>
BGLB006210-PB	2,603	3,122	catepsina L1-like	6	4	368	1964	7007 <sub>4</sub>
BGLB023192-PA	1,356	2,723	endo-1,4-beta-xilanase A-like	10	10	196	87938	7618 <sub>2</sub>
BGLB016564-PA	2,508	4,500	ATPase de cálcio do retículo sarcoplásmico/endoplásmico 1-like	19	19	325	10866	1479 <sub>9</sub>

### 3.2. Ontologia Gênica (Gene Ontology – GO)

Os processos biológicos (GO) (Figuras 2 e 3) mais comum em proteínas com expressão aumentada foram o processo de oxidação redução (GO:00055114 - 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase *-like* e glucose desidrogenase [FAD, quinona]-*like*) e a proteólise (GO:0006508 – Proteína não caracterizada LOC106059779 e Peptidase processadora mitocondrial- subunidade beta-*like*). Relativamente à função molecular (GO) (Figuras 4 e 5) mais comum entre as proteínas encontradas com expressão aumentada é a ligação a heme (*heme binding*) (GO: 0020037 – hemoglobinas Tipo 2 e proteínas globina *like*) seguido de atividade catalítica (GO:0003824 - arginina quinase e endoglucanase E-4-*like*), enquanto nas proteínas com expressão diminuída a função molecular mais comum foi ligação a proteína (*protein binding*) (GO:0005515 - filamina-A-*like* isoforme X4; fator de elongação 1-gamma-*like* e SCO-spondin-*like*). Dentre os componentes celulares (Figuras 6 e 7) encontrados, os mais comuns foram o nucleossoma (GO:0000786 - histona H3-*like* e histona H2A/H2B/H3/H4) e região extracelular (GO:0005576 – Biomphalisina e Ependimina 1 *like*) (Figure 6).

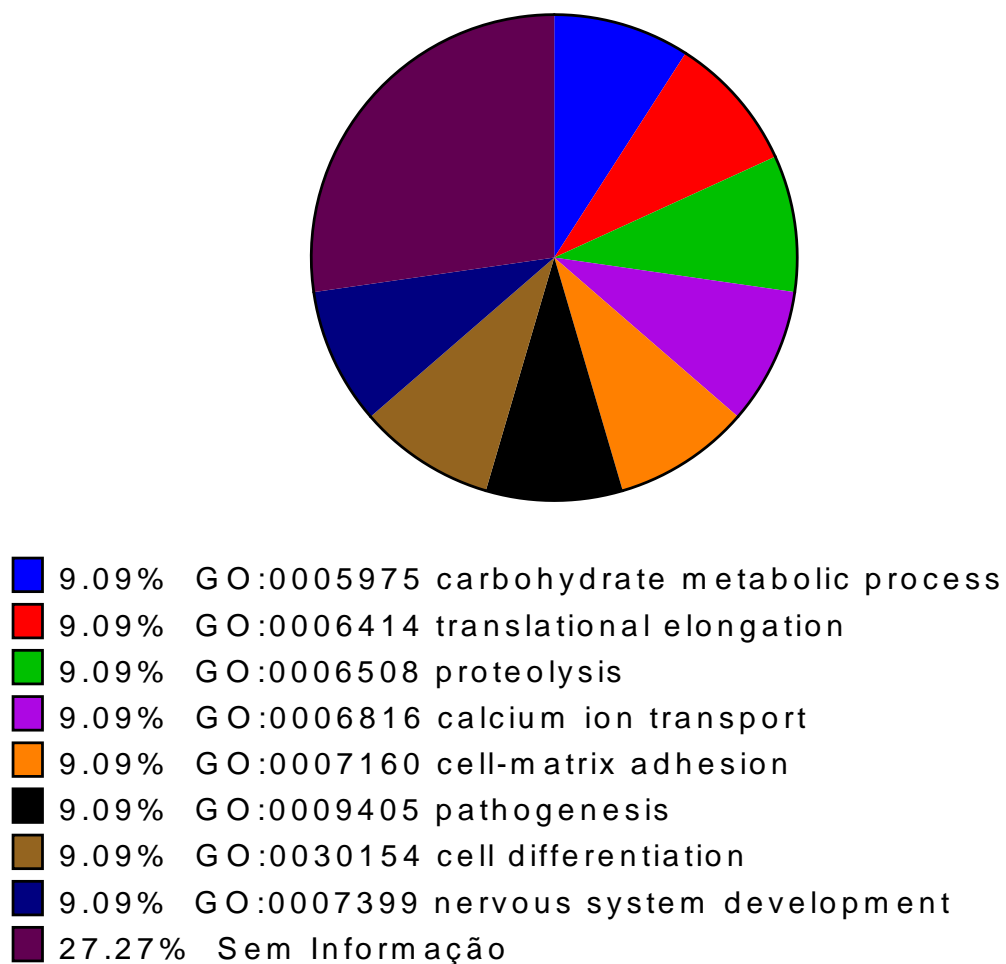
**Processo Biológico (GO) - Proteínas com expressão aumentada**



**Figura 2** – Processos biológicos (GOs) de proteínas com expressão aumentada após a infecção por *S. mansoni*. Os GOs foram adquiridos por busca manual (vectorbase.org) e a porcentagem calculada dividindo o número de proteínas (com determinado GO) pelo número total de proteínas.

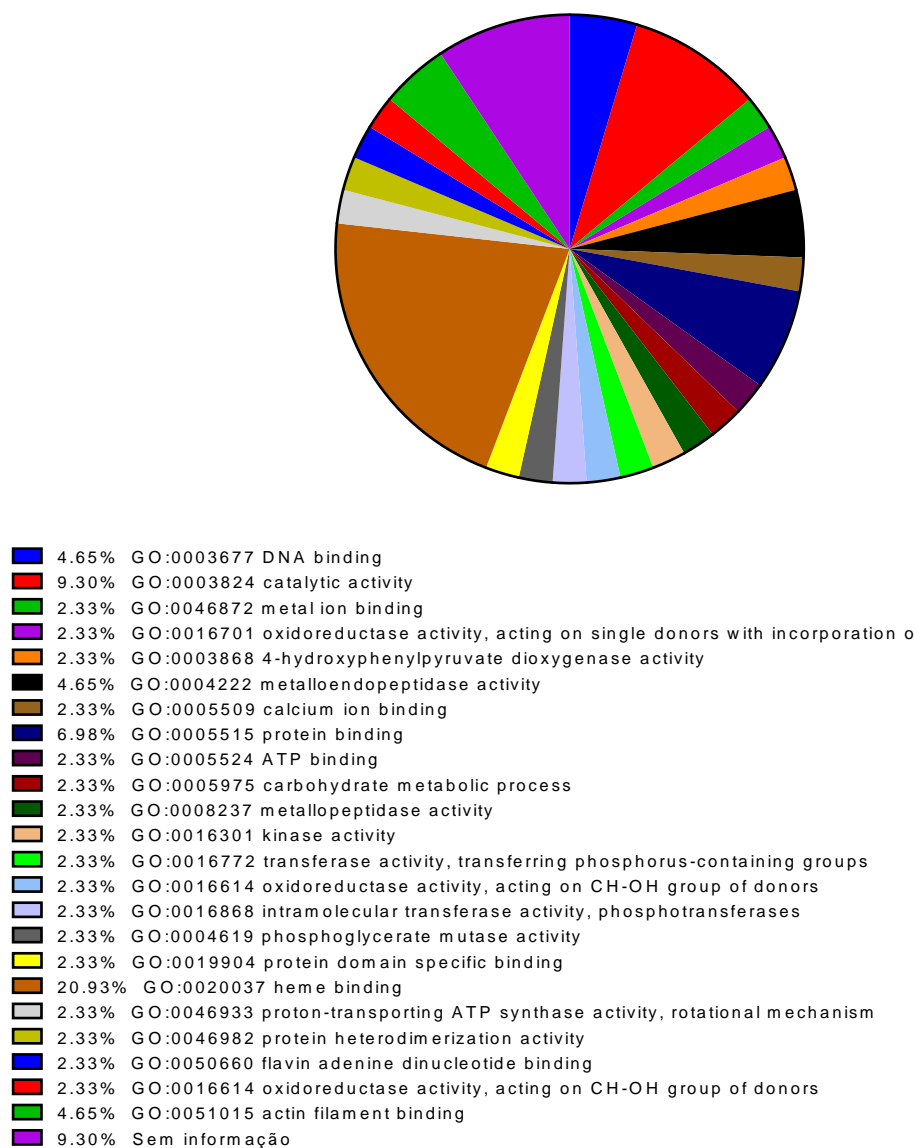


### Processo Biológico (GO) - Proteínas com expressão diminuída



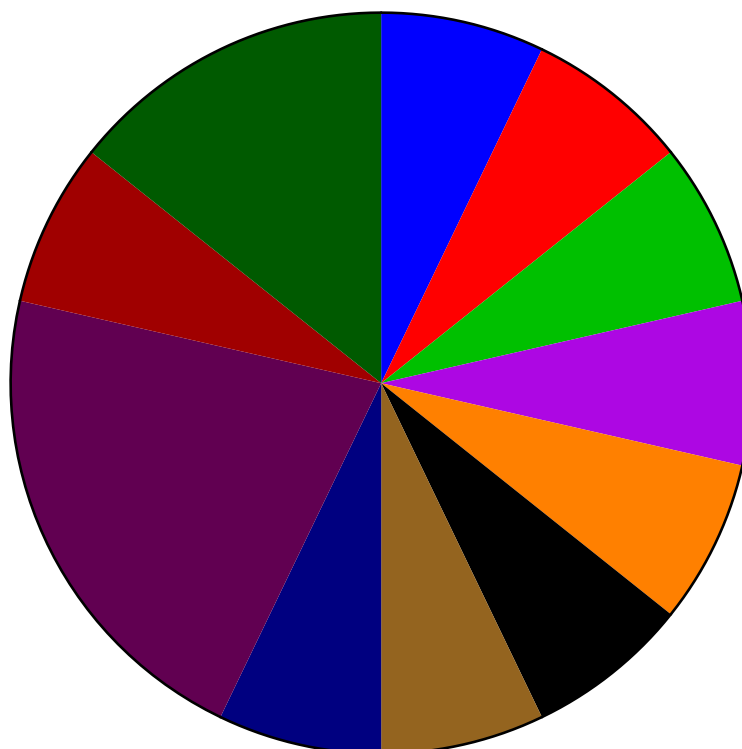
**Figure 3** – Processos biológicos (GOs) de proteínas com expressão diminuída após a infecção por *S. mansoni*. Os GOs foram adquiridos por busca manual (vectorbase.org) e a percentagem calculada dividindo o número de proteínas (com determinado GO) pelo número total de proteínas.

### Função Molecular (GO) - Proteínas com expressão aumentada



**Figura 4** – Função molecular (GOs) de proteínas com expressão aumentada após a infecção por *S. mansoni*. Os GOs foram adquiridos por busca manual (vectorbase.org) e a percentagem calculada dividindo o número de proteínas (com determinado GO) pelo número total de proteínas.

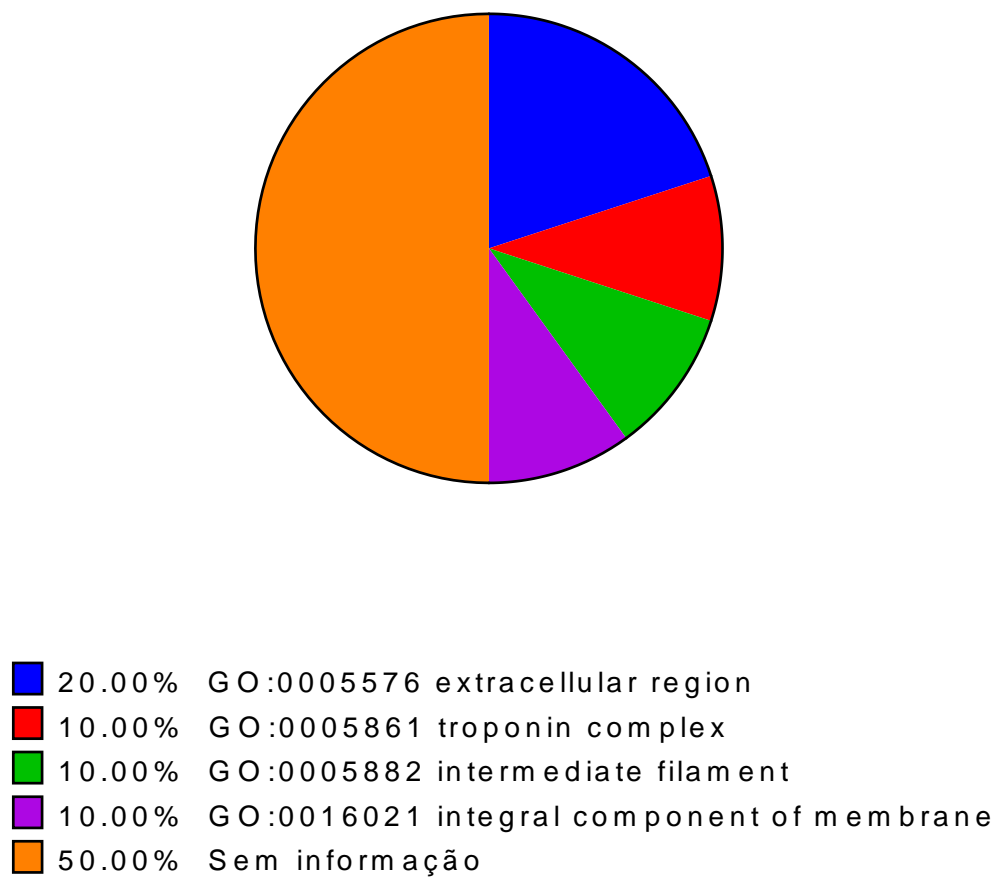
**Função Molecular (GO) - Proteínas com expressão diminuída**



- 7.14% GO:0000166 nucleotide binding
- 7.14% GO:0003746 translation elongation factor activity
- 7.14% GO:0004553 hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
- 7.14% GO:0005198 structural molecule activity
- 7.14% GO:0005388 calcium-transporting ATPase activity
- 7.14% GO:0005509 calcium ion binding
- 7.14% GO:0008234 cysteine-type peptidase activity
- 7.14% GO:0008234 cysteine-type peptidase activity
- 21.43% GO:0005515 protein binding
- 7.14% GO:0016798 hydrolase activity, acting on glycosyl bonds
- 14.29% Sem informação

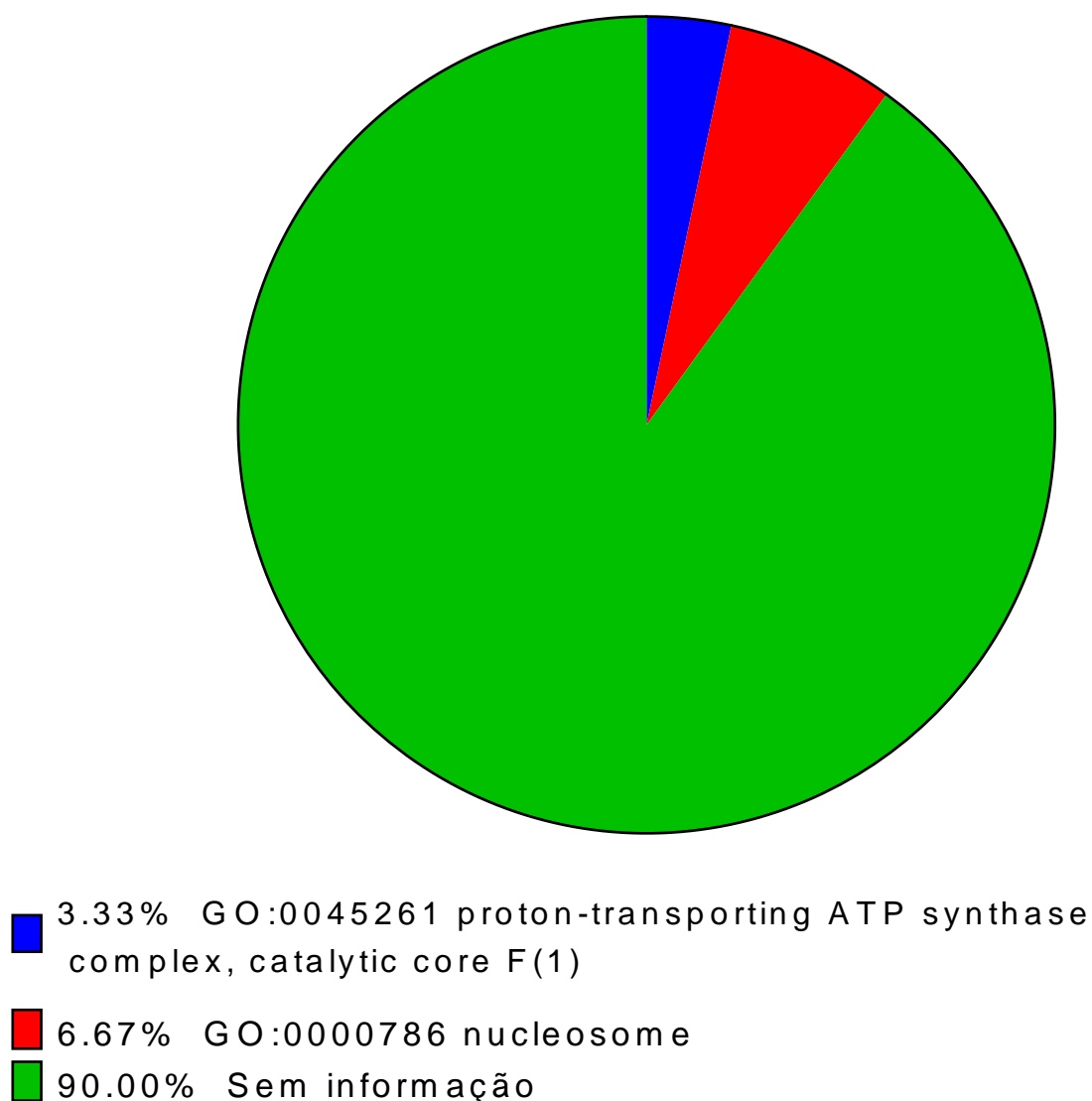
**Figura 5** – Função molecular (GOs) de proteínas com expressão diminuída após a infecção por *S. mansoni*. Os GOs foram adquiridos por busca manual (vectorbase.org) e a percentagem calculada dividindo o número de proteínas (com determinado GO) pelo número total de proteínas.

### Componente Celular (GO) - Proteínas com expressão diminuída



**Figura 6** – Componente celular (GOs) de proteínas com expressão diminuída após a infecção por *S. mansoni*. Os GOs foram adquiridos por busca manual (vectorbase.org) e a percentagem calculada dividindo o número de proteínas (com determinado GO) pelo número total de proteínas.

### Componente Celular (GO) - Proteínas com expressão aumentada

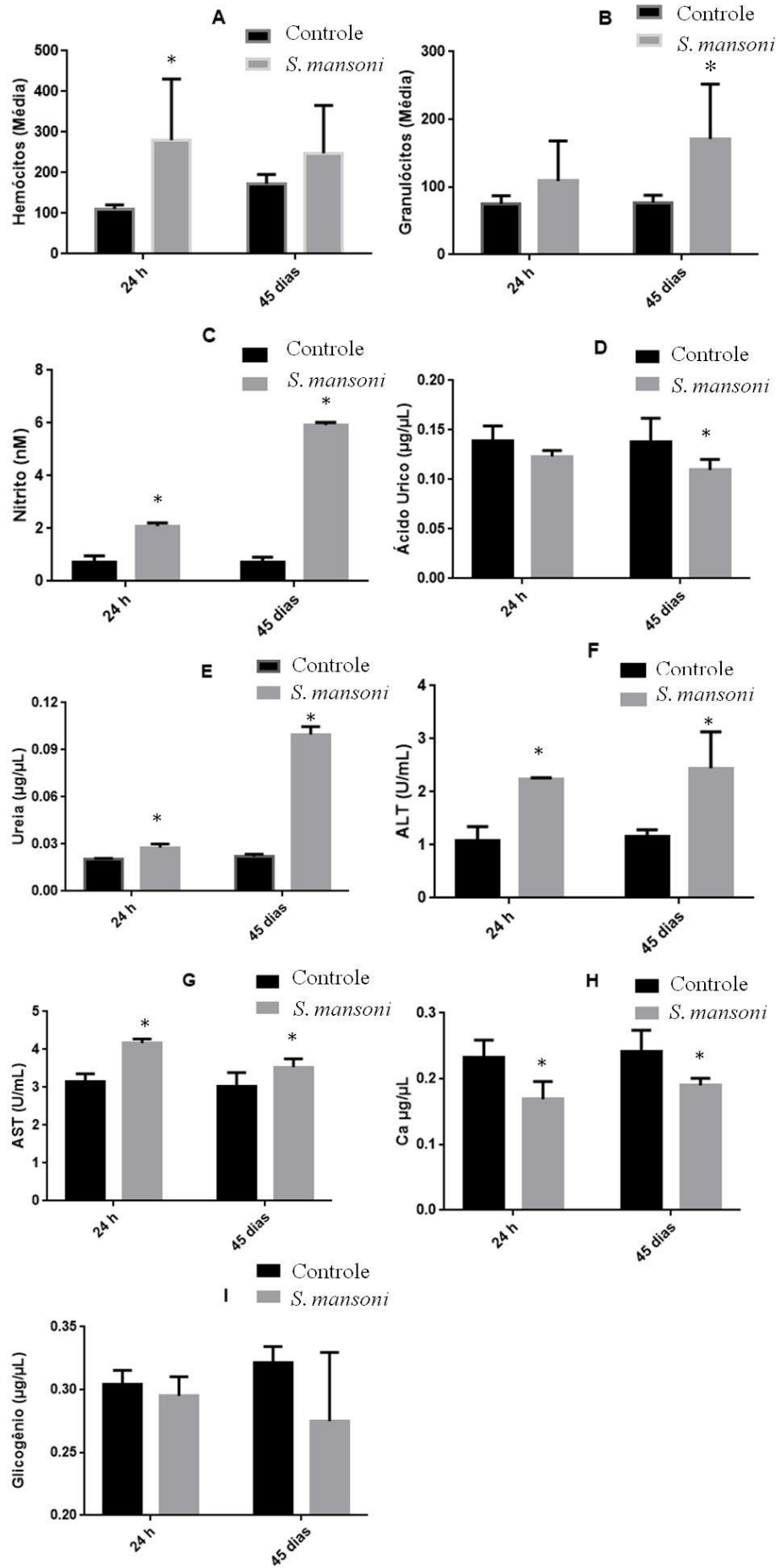


**Figura 7** – Componente celular (GOs) de proteínas com expressão aumentada após a infecção por *S. mansoni*. Os GOs foram adquiridos por busca manual (vectorbase.org) e a percentagem calculada dividindo o número de proteínas (com determinado GO) pelo número total de proteínas.

### 3.3. Análise hemolinfa

O número de hemócitos circulantes foi significativamente maior após 24 h pi comparando com o grupo não infectado ( $p < 0,05$ ). Não foi encontrada diferença estatística 45 dias pi (Figura 8 – A). O número de granulócitos circulantes na hemolinfa não diferiu após a infecção (Figura 8 – B). Os níveis de nitrito (Figura 8 – C) e ureia (Figura 8 – E) e a atividade

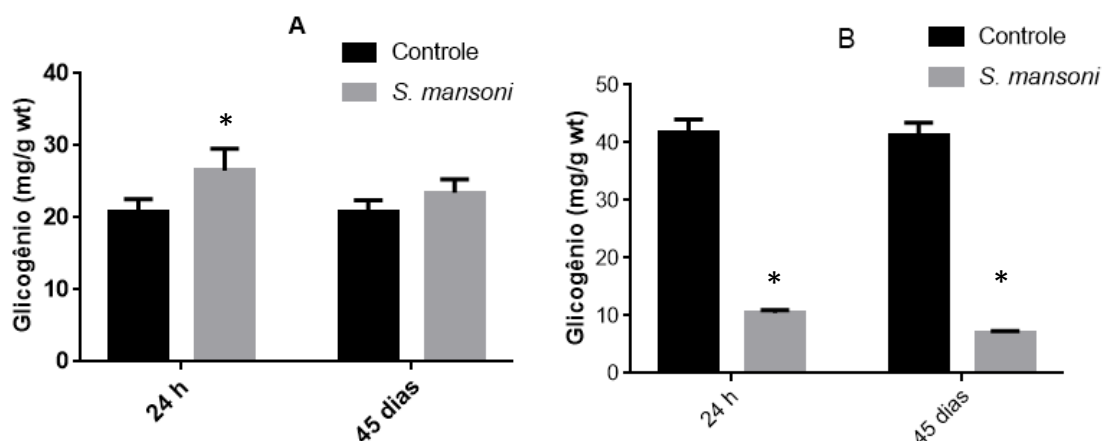
das aminotransferases (ALT e AST) (Figura 8 – F, G) foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em caramujos com 24 h e 45 dias de infecção. A concentração de cálcio na hemolinfa (Figura 8 – H) foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) 24h e 45 dias após infecção comparando com caramujos não infectados. A concentração de ácido úrico (Figura 8 – D) foi significativamente menor após 45 dias de infecção. Não foi observada diferença estatisticamente significativa nos níveis de glicogênio na hemolinfa (Figura 8 – I).



**Figura 8** – Análise da hemolinfa de *B. glabrata* com 24 h (n=5) ou 45 dias (n=5) de infecção com *S. mansoni* e respectivo controle não infectado (n=5). (A) Número médio de hemócitos; (B) número médio de granulócitos; (C) conteúdo de nitrito da hemolinfa (nM); (D) conteúdo de ácido úrico na hemolinfa ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ); (E) conteúdo de uréia na hemolinfa ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ); (F) Atividade de ALT (U/mL); (G) Atividade de AST (U/mL); (H) conteúdo de cálcio na hemolinfa ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ); (I) conteúdo de glicogênio na hemolinfa ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). \*tem diferença significativa comparando com o grupo não infectado (*One-way ANOVA*,  $p<0.05$ ).

### 3.4. Conteúdo de glicogênio nos tecidos

O conteúdo de glicogênio foi significativamente maior na região cefalopodal 24 h após a infecção com *S. mansoni*, não mostrando diferença significativa 45 dias pi (Figura 9 – A). No complexo glândula digestiva – gônada a concentração de glicogênio foi significativamente inferior ( $p<0,05$ ) tanto 24 h e 45 dias pi (Figura 10 – B).



**Figura 9** – Quantificação de hemolinfa nos tecidos de *B. glabrata* 24 h (n=5) e 45 dias (n=5) após a infecção por *S. mansoni* e respectivo grupo controle não infectado (n=5). (A) conteúdo de glicogênio da região cefalopodal; (B) conteúdo de glicogênio do complexo gonadal – glândula digestiva. \*tem diferença significativa comparando com o grupo não infectado (*One-way ANOVA*,  $p<0.05$ ).

## 4. Discussão

Os hemócitos, em particular os granulócitos, são as principais células imunes em *B. glabrata*. De acordo com Pereira et al. (2006), durante a infecção, o número de hemócitos circulantes na hemolinfa nem sempre aumenta devido à migração destas células para o local de infecção. Os resultados suportam esta hipótese, uma vez que o número de hemócitos circulantes aumentou após 24 h de infecção, contudo, após 45 dias não foram encontradas



diferenças significativas com o grupo não infectado, sugerindo que as células imunes migraram para o local de infecção (Figura 8). Além disso, semelhante ao encontrado por Wu et al. (2017), entre proteínas com expressão aumentada em caramujos infectados, as mais comuns que encontramos foram proteínas de hemoglobina (Tipos 2) e proteínas globina-*like*, sugerindo que existe sim um aumento no número de hemócitos. Os hemócitos produzem ROS e NO para combater a infecção (Pereira et al., 2006), não sendo por isso surpreendente que os níveis de nitrito foram significativamente mais elevados em caramujos infectados. A filamina A (FlnA) é uma proteína importante em diversos processos celulares, como por exemplo a migração de células. O papel desta proteína em *B. glabrata* não é bem definido, no entanto, em modelo murino, FlnA mostrou ser um regulador negativo de adesão celular dependente de integrina  $\beta 2$  ( *$\beta 2$  integrin-dependent cell adhesion*) e da produção de ROS (Uotila et al., 2017), assim sendo, considerando a diminuição de expressão desta proteína em caramujos infectados, é possível que ela também regule negativamente a produção de ROS e/ou a capacidade adesão celular de hemócitos. Outra proteína que pode estar envolvida na adesão celular é a proteína ependimina 1-*like* (*Mammalian ependymin-related protein (MERP) 1-like*), esta proteína um dos constituintes da matriz celular com propriedades anti-adesivas (Bouchut et al., 2007), propriedades estas que podem justificar a sua diminuição em caramujos infectados uma vez que poderiam interferir com a tentativa do molusco encapsular o parasita.

Entre as proteínas com expressão aumentada em caramujos infectados, várias estão envolvidas em vias de produção de energia. Endoglucanase A-*like* e endoglucanase E-4-*like* são celulasas, quebrando a celulose em monossacarídeos como a  $\beta$ -glucose (Behera et al., 2017). A proteína 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase-*like* está envolvida na conversão de L-tirosina em acetoacetato, indicando a ativação do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (Silva et al., 2017). A arginina quinase, que pertence à família fosfagene quinase, tem um papel importante na manutenção da homeostase energética. Glucose desidrogenase [FAD, quinona]-*like* é uma oxirredutase que participa na via de pentoses de fosfato, enquanto fosfoglicerato mutase é a enzima catalisadora do passo 8 da glicólise, contribuindo ambas as enzimas para a produção de ATP (Berg et al., 2002; Mele et al., 2018). ATP sintase subunidade beta, mitocondrial-*like* e está envolvida na produção de ATP a partir de ADP (Musante et al., 2007). O aumento de expressão de todas estas proteínas envolvidas na produção energética em *B. glabrata* infectada sugere que há um aumento das necessidades energéticas do caramujo. Além disso, observando a quantificação dos níveis de glicogênio, observamos uma diminuição significativa na região cefalopodal e no complexo gonadal – glândula digestiva 24

h pi, suportando a hipótese que ocorreu um aumento das necessidades energéticas após a infecção. O conteúdo de glicogênio na hemolinfa não foi significativamente diferente após infecção, sugerindo que houve mobilização das reservas energéticas na região do complexo gonadal – glândula digestiva para promoção da homeostase de glucose (Faro et al., 2013). Há um aumento na gluconeogenese para compensar a diminuição de glicogênio (Mello-Silva et al., 2010), caracterizado pelo aumento da atividade das aminotransferases, uma vez que AST e ALT são enzimas que desempenham um papel importante nesta via (Pinheiro et al., 2001). Ainda, durante a gluconeogenese, existe uma maior desaminação de aminoácidos, que servem de substrato para a formação de glucose e, conseqüentemente ocorre um acúmulo de produtos de nitrogênio que são tóxicos para o caramujo. Para lidar com este acúmulo, ocorre uma aceleração da via de uréia, deixando o caramujo de ser amoniotélico e passando a ser uriotélico, ou seja, o caramujo deixa de excretar amônia e passa a excretar uréia, um produto menos tóxico (Becker and Schmale, 1975; Souza et al., 2000). Semelhante ao por nós observado, Tunholi-Alves et al. (2012) também observaram um aumento significativo de uréia em *B. glabrata* infectada com *Angiostrongylus cantonensis*.

A diminuição dos níveis de cálcio na hemolinfa de caramujos infectados pode ser atribuída à maior necessidade deste íon, não só pela absorção do parasita que absorve cálcio para o seu desenvolvimento e necessidades metabólicas, mas também pelo aumento das necessidades energéticas do caramujo, que obtém energia por reações oxidativas catalisadas por enzimas que utilizam o cálcio como cofator (Tunholi-Alves et al., 2014). Além do mais, o dano causado pelo parasita nos tecidos pode causar um decréscimo nos níveis de cálcio na hemolinfa uma vez que este íon é depositado nos tecidos do hospedeiro em resposta a reações inflamatórias provocadas pelo parasita, depósito este que diminui a capacidade de locomoção do molusco e, conseqüentemente, a sua capacidade de se alimentar, diminuindo ainda mais as concentrações de cálcio (Mostafa, 2007; Tunholi-Alves et al., 2014).

Actina citoplasmática (*Cytoplasmic-like actin*) foi encontrada com expressão aumentada em caramujos infectados. Não se conhece o papel exato desta proteína, no entanto, em mosquitos *Anopheles gambiae*, a actina citoplasmática é um fator imune extracelular importante responsável por mediar a fagocitose (Sandiford et al., 2015), sendo, por isso, possível que em *B. glabrata* tenha uma função semelhante, onde a actina se liga ao esporocisto numa tentativa de marcar para fagocitose.

A proteína gelsolina-like 2 (encontrada com expressão aumentada após a infecção) é uma proteína com capacidade de se ligar a actina. Gelsolinas são reguladores

fundamentais na montagem e desmontagem de filamentos de actina (Sandiford et al., 2015). Henty-Ridilla et al. (2013) mostraram que estas proteínas desempenham um papel importante na exposição dos filamentos de actina a receptores lectina C-tipo (*C-type lectin receptors*) como resposta a sinais microbianos em plantas. O aumento de expressão destas proteínas em *B. glabrata* pode sugerir que estas desempenham um papel semelhante no caramujo, expondo os filamentos de actina do esporocisto a lectinas do tipo C (*C-type lectin-related proteins* – CREPs).

Adema et al. (2010) reportou a superexpressão das sequências codificantes das histonas H2A, H2AV e H3.3, das quais a histona H3.3 tinha a maior expressão, semelhantemente, também encontramos um aumento de expressão de histona H2A/H2B/H3/H4 e de histona H3-like. As histonas têm um papel importante na remodelação da cromatina durante a mitose, atuam como receptores para vírus e bactérias na superfície celular, são componentes de armadilhas extracelulares e exercem atividade bactericida (Sandiford et al., 2015), podendo o aumento da sua expressão em caramujos infectados ser indicativo de função imunológica no molusco.

Proteínas ligantes a guanina nucleotídica (*guanine nucleotide-binding proteins*), encontradas com expressão aumentada em caramujos infectados, estão envolvidas em diversas vias de transdução de sinal (Spiegel, 1987). Num trabalho publicado por Zhang et al. (2015) esta proteína também foi encontrada aumentada em *B. glabrata* após exposição a moluscicida, podendo indicar que de alguma forma esta proteína está envolvida na resposta do caramujo ao estresse.

Fator de transformação do crescimento beta (*transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3-like* – TGF- $\beta$ ) e a proteína 14-3-3 epsilon-like são proteínas sinalizadoras, que semelhante ao observado por Wu et al. (2017), estavam com expressão aumentada em caramujos infectados com *S. mansoni*. A proteína 14-3-3 representa uma família relativamente conservada de proteínas com capacidade de se ligar a uma gama funcionalmente diversa de outras proteínas sinalizadoras, mostrou ser fundamental na regulação do desenvolvimento, longevidade, metabolismo e resistência ao estresse em *Caenorhabditis elegans*, contudo, embora estas proteínas tenham sido isoladas e caracterizadas como tendo um papel importante na biologia de parasitas e imunologia no contexto parasita – hospedeiro, pouca informação existe sobre qual o seu papel em concreto (Wang et al., 2013).

Outra proteína com expressão aumentada em caramujos infectados foi a proteína não caracterizada LOC106059779, uma proteína com um domínio Peptidase M12B,

ADAM/reprolisina. Proteínas com este domínio são metaloproteínases de matriz que atuam na morfogênese/remodelação de tecidos, inflamação e têm sido associadas com atividade ligante larval. Wu et al. (2017) também encontrou expressão diferencial destas proteínas no plasma de caramujos suscetíveis, sugerindo que a presença de níveis elevados desta proteína pode ser vantajosa para o parasita, degradando a matriz proteica endógena do hospedeiro, facilitando o movimento do parasita pelos tecidos do caramujo.

É interessante referir que entre as proteínas cuja expressão diminuiu após infecção por *S. mansoni*, foram encontradas duas proteínas potencialmente envolvidas na resposta imune. A biomphalisina, uma aerolisina formadora de poros, conhecida pela sua atividade citolítica no esporocisto (Galinier et al., 2013) e a catepsina L1-like (*Cathepsin L1-like protein*). A função da catepsina em *B. glabrata* não é conhecida, contudo, em mamíferos, estas proteínas estão envolvidas em processos funcionais das células apresentadoras de antígenos (APCs) e em *Drosophila* catepsina L (CP1) está presente nos grânulos dos hemócitos, sendo especulado o seu envolvimento na fagocitose (Lefebvre et al., 2008). Seria esperado um aumento na expressão biomphalisina e catepsina em caramujos infectados, no entanto, neste trabalho, estas proteínas se encontravam tinham expressão diminuída comparando com caramujos não infectados. Num trabalho publicado por Myers et al. (2008) caramujos resistentes a *S. mansoni* tinham maior nível de transcriptos de catepsina B quando comparando com moluscos sensíveis, enquanto, noutro trabalho publicado por Arican-Goktas et al. (2014), foi demonstrado que *S. mansoni* conseguia aumentar a expressão de HSP-70 em caramujos sensíveis através do reposicionamento espacial de genes ativados, enquanto em caramujos resistentes à infecção esse reposicionamento não acontecia. É possível que um processo semelhante ocorra, onde o parasita regula (*down-regulates*) a expressão de biomphalisina e catepsina para conseguir infectar o hospedeiro. Também é plausível que o parasita utilize o mesmo processo para aumentar a expressão de proteínas ADAM-TS, uma vez que, como referido anteriormente, estas podem facilitar o movimento do parasita pelos tecidos do hospedeiro.

É ainda importante referir que para confirmar se as proteínas encontradas pertenciam a *B. glabrata* e não a *S. mansoni*, foi feita uma busca de proteínas utilizando o banco de dados de proteínas de *S. mansoni*, não tendo sido encontradas proteínas significativas e assim confirmando que as proteínas analisadas pertenciam ao hospedeiro invertebrado.

## 5. Conclusão

Embora haja uma grande falta de dados no que refere à função específica das proteínas do caramujo, é possível hipotetizar as suas funções por comparação com proteínas homólogas de outros organismos. Assim como ligando essas funções com parâmetros imunológicos e metabólicos. Neste trabalho não só identificamos diversas proteínas que potencialmente estão envolvidas na resposta imune contra o parasita, mas também encontramos indícios de que o parasita consegue, até certo ponto, regular a expressão de algumas destas proteínas. A identificação destas proteínas é de extrema importância, pois poderá levar a estratégias mais eficazes para controle da esquistossomose.

## 6. Referências

- Adema, C.M., Hanington, P.C., Lun, C.-M., Rosenberg, G.H., Aragon, A.D., Stout, B.A., Lennard Richard, M.L., Gross, P.S., Loker, E.S., 2010. Differential transcriptomic responses of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Mollusca) to bacteria and metazoan parasites, *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraense* (Digenea, Platyhelminthes). *Molecular Immunology* 47, 849-860.
- Adema, C.M., Hillier, L.W., Jones, C.S., Loker, E.S., Knight, M., Minx, P., Oliveira, G., 2017. Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. 8, 15451.
- Arican-Goktas, H.D., Ittiprasert, W., Bridger, J.M., Knight, M., 2014. Differential spatial repositioning of activated genes in *Biomphalaria glabrata* snails infected with *Schistosoma mansoni*. *PLoS neglected tropical diseases* 8, e3013.
- Bayne, C.J., 2009. Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: a 2009 assessment. *Molecular and biochemical parasitology* 165, 8-18.
- Becker, W., Schmale, H., 1975. The nitrogenous products of degradation—Ammonia, urea and uric acid—In the hemolymph of the snail *Biomphalaria glabrata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 51, 407-411.
- Behera, B.C., Sethi, B.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K., Thatoi, H.N., 2017. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 15, 197-210.

- Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L., 2002. Biochemistry, 5 Edition. W. H. Freeman and Company, New York.
- Bouchut, A., Coustau, C., Gourbal, B., Mitta, G., 2007. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: new candidate genes evidenced by a suppressive subtractive hybridization approach. *Parasitology* 134, 575-588.
- Campos, Y.R., Carvalho, O.S., Goveia, C.O., Romanha, A.J., 2002. Genetic variability of the main intermediate host of the *Schistosoma mansoni* in Brazil, *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) assessed by SSR-PCR. *Acta tropica* 83, 19-27.
- Chilcote, M.E., Wasson, R.D., 1958. A new micro method for the colorimetric determination of calcium in serum or urine. *Clinical chemistry* 4, 200-210.
- Coustau, C., Gourbal, B., Duval, D., Yoshino, T.P., Adema, C.M., Mitta, G., 2015. Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade. *Fish & Shellfish Immunology* 46, 5-16.
- Cox, J., Mann, M., 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology* 26, 1367-1372.
- Faro, M.J., Perazzini, M., Correa Ldos, R., Mello-Silva, C.C., Pinheiro, J., Mota, E.M., de Souza, S., de Andrade, Z., Junior, A.M., 2013. Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. *Experimental parasitology* 134, 228-234.
- Galinier, R., Portela, J., Mone, Y., Allienne, J.F., Henri, H., Delbecq, S., Mitta, G., Gourbal, B., Duval, D., 2013. Biomphalysin, a new beta pore-forming toxin involved in *Biomphalaria glabrata* immune defense against *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog* 9, e1003216.
- Galinier, R., Roger, E., Mone, Y., Duval, D., Portet, A., 2017. A multistrain approach to studying the mechanisms underlying compatibility in the interaction between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. 11, e0005398.
- Giannelli, A., Cantacessi, C., Colella, V., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2016. Gastropod-Borne Helminths: A Look at the Snail-Parasite Interplay. *Trends in parasitology* 32, 255-264.

- Giovanelli, A., Vieira, M.V., Silva, C.L.P.A.C.d., 2002. Interaction between the Intermediate Host of Schistosomiasis in Brazil *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae) and a Possible Competitor *Melanoides tuberculata* (Thiaridae): I. Laboratory Experiments. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 363-369.
- Henty-Ridilla, J.L., Shimono, M., Li, J., Chang, J.H., Day, B., Staiger, C.J., 2013. The plant actin cytoskeleton responds to signals from microbe-associated molecular patterns. *PLoS pathogens* 9, e1003290-e1003290.
- Lefebvre, C., Vandenbulcke, F., Bocquet, B., Tasiemski, A., Desmons, A., Verstraete, M., Salzet, M., Cocquerelle, C., 2008. Cathepsin L and cystatin B gene expression discriminates immune coelomic cells in the leech *Theromyzon tessulatum*. *Developmental and comparative immunology* 32, 795-807.
- Lo, S., Russell, J.C., Taylor, A.W., 1970. Determination of glycogen in small tissue samples. *Journal of applied physiology* 28, 234-236.
- Martins-Souza, R.L., Pereira, C.A.J., Coelho, P.M.Z., Negrão-Corrêa, D., 2003. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. *Parasitology research* 91, 500-507.
- Mele, L., Paino, F., Papaccio, F., Regad, T., Boocock, D., Stiuso, P., Lombardi, A., Liccardo, D., Aquino, G., Barbieri, A., Arra, C., Coveney, C., La Noce, M., Papaccio, G., Caraglia, M., Tirino, V., Desiderio, V., 2018. A new inhibitor of glucose-6-phosphate dehydrogenase blocks pentose phosphate pathway and suppresses malignant proliferation and metastasis *in vivo*. *Cell death & disease* 9, 572-572.
- Mello-Silva, C.C., Vilar, M.M., Vasconcellos, M.C., Pinheiro, J., Rodrigues Mde, L., 2010. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 105, 492-495.
- Mitta, G., Gourbal, B., Grunau, C., Knight, M., Bridger, J.M., Theron, A., 2017. The Compatibility Between *Biomphalaria glabrata* Snails and *Schistosoma mansoni*: An Increasingly Complex Puzzle. *Advances in parasitology* 97, 111-145.

- Mone, Y., Ribou, A.C., Cosseau, C., Duval, D., Theron, A., Mitta, G., Gourbal, B., 2011. An example of molecular co-evolution: reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni*/*Biomphalaria glabrata* interactions. *Int J Parasitol* 41, 721-730.
- Mostafa, O.M., 2007. Effects of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infections on calcium content in their intermediate hosts. *Parasitology research* 101, 963-966.
- Musante, L., Candiano, G., Bruschi, M., Santucci, L., Marco Ghiggeri, G., 2007. 67 - ANTI-ATP SYNTHASE  $\beta$ -CHAIN AUTOANTIBODIES, In: Shoenfeld, Y., Gershwin, M.E., Meroni, P.L. (Eds.) *Autoantibodies (Second Edition)*. Elsevier, Burlington, pp. 547-552.
- Myers, J., Ittiprasert, W., Raghavan, N., Miller, A., Knight, M., 2008. Differences in cysteine protease activity in *Schistosoma mansoni*-resistant and -susceptible *Biomphalaria glabrata* and characterization of the hepatopancreas cathepsin B Full-length cDNA. *The Journal of parasitology* 94, 659-668.
- Olivier, L., Stirewalt, M.A., 1952. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of parasitology* 38, 19-23.
- Pereira, C.A., Martins-Souza, R.L., Coelho, P.M., Lima, W.S., Negrao-Correa, D., 2006. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* susceptibility to *Schistosoma mansoni*. *Acta tropica* 98, 224-233.
- Pinheiro, J., Gomes, E.M., Chagas, G.M., 2001. Aminotransferases activity in the hemolymph of *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthonychidae) under starvation. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 96, 1161-1164.
- Sanders, G.T.B., Pasman, A.J., Hoek, F.J., 1980. Determination of uric acid with uricase and peroxidase. *Clinica Chimica Acta* 101, 299-303.
- Sandiford, S.L., Dong, Y., Pike, A., Blumberg, B.J., Bahia, A.C., Dimopoulos, G., 2015. Cytoplasmic Actin Is an Extracellular Insect Immune Factor which Is Secreted upon Immune Challenge and Mediates Phagocytosis and Direct Killing of Bacteria, and Is a *Plasmodium* Antagonist. *PLOS Pathogens* 11, e1004631.
- Searcy, R.L., Reardon, J.E., Foreman, J.A., 1967. A new photometric method for serum urea nitrogen determination. *The American journal of medical technology* 33, 15-20.
- Silva, L.D., Amaral, V.C.S., Vinaud, M.C., Castro, A.M., Rezende, H.H.A., Santos, D.B., Mello-Silva, C.C., Bezerra, J.C.B., 2017. Changes in energetic metabolism of *Biomphalaria*



*glabrata* (Mollusca, Planorbidae) in response to exogenous calcium. Brazilian Journal of Biology 77, 304-311.

Souza, R.M.d., Gomes, E.M., Chagas, G.M., Pinheiro, J., 2000. The influence of starvation and *Eurytrema coelomaticum* infection on the nitrogenous products of degradation in the hemolymph of *Bradybaena similaris*. Brazilian Archives of Biology and Technology 43, 0-0.

Spiegel, A.M., 1987. Signal transduction by guanine nucleotide binding proteins. Molecular and cellular endocrinology 49, 1-16.

Tunholi-Alves, V.M., Tunholi, V.M., Garcia, J.S., Costa-Neto, S.F., Maldonado, A.J., Santos, M.A.J., Thiengo, S.C., Pinheiro, J., 2014. Changes in the calcium metabolism of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with *Angiostrongylus cantonensis*. Journal of helminthology 88, 160-165.

Tunholi-Alves, V.M., Tunholi, V.M., Pinheiro, J., Thiengo, S.C., 2012. Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata*. Experimental parasitology 131, 143-147.

Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., 2016. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. 13, 731-740.

Uotila, L.M., Guenther, C., Savinko, T., Lehti, T.A., Fagerholm, S.C., 2017. Filamin A Regulates Neutrophil Adhesion, Production of Reactive Oxygen Species, and Neutrophil Extracellular Trap Release. The Journal of Immunology 199, 3644-3653.

Wang, T., Van Steendam, K., Dhaenens, M., Vlamincx, J., Deforce, D., Jex, A.R., Gasser, R.B., Geldhof, P., 2013. Proteomic Analysis of the Excretory-Secretory Products from Larval Stages of *Ascaris suum* Reveals High Abundance of Glycosyl Hydrolases. PLoS neglected tropical diseases 7, e2467.

WHO, 2016. Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2014. Relevé épidémiologique hebdomadaire 91, 53-60.

Wu, X.J., Dingirard, N., Sabat, G., Lui, H.D., Gonzalez, L., Gehring, M., Bickham-Wright, U., Yoshino, T.P., 2017. Proteomic analysis of *Biomphalaria glabrata* plasma proteins with binding affinity to those expressed by early developing larval *Schistosoma mansoni*. PLoS Pathog 13, e1006081.

Wu, Y., Williams, E.G., Dubuis, S., Mottis, A., Jovaisaite, V., Houten, S.M., Argmann, C.A., Faridi, P., Wolski, W., Kutalik, Z., Zamboni, N., Auwerx, J., Aebersold, R., 2014. Multilayered genetic and omics dissection of mitochondrial activity in a mouse reference population. *Cell* 158, 1415-1430.

Zhang, S.-M., Buddenborg, S.K., Adema, C.M., Sullivan, J.T., Loker, E.S., 2015. Altered Gene Expression in the Schistosome-Transmitting Snail *Biomphalaria glabrata* following Exposure to Niclosamide, the Active Ingredient in the Widely Used Molluscicide Bayluscide. *PLoS neglected tropical diseases* 9, e0004131.

### Capítulo III – Alterações Metabólicas em *Biomphalaria glabrata* infectada por *Angiostrongylus cantonensis*

#### Resumo

*Angiostrongylus cantonensis* é a principal causa de meningite eosinofílica humana. Os seres humanos são hospedeiros acidentais, se infectando ao ingerir os hospedeiros intermediários ou paratênicos crus. Após a ingestão, a larva migra para o cérebro onde morre causando a doença. O controle dos moluscos (hospedeiros intermediários) é importante uma vez que não existe tratamento para esta doença. Para desenvolver estratégias de controle mais eficazes, é necessário primeiro entender as alterações que ocorrem no caramujo durante a infecção. Assim sendo, o propósito neste trabalho foi caracterizar as alterações proteômicas, metabólicas e imunológicas em *Biomphalaria glabrata* 24h (larva L1) e 45 dias (larva L3) após a infecção (pi). Com este objetivo, foram extraídas proteínas de moluscos (24h pi) usando tampão Tris-Uréia que posteriormente foram digeridas com tripsina. Os espectros de massas foram adquiridos utilizando um espectrômetro de massas Thermo LTQ Orbitrap Velos e analisados com auxílio dos *softwares* MaxQuant e Perseus. A hemolinfa dos caramujos foi coletada 24 h e 45 dias após a infecção, os hemócitos foram contados em câmara de Neubauer e os níveis de uréia, ácido úrico, óxido nítrico (NO), cálcio, glicogênio e atividade de aspartato e alanina aminotransferases (AST e ALT, respectivamente) foram medidos. Os caramujos também foram dissecados e os níveis de glicogênio da região cefalopodal e do complexo gonadal – glândula digestiva foram quantificados. Durante a infecção por *A. cantonensis* observamos um aumento significativo dos hemócitos totais e granulócitos e também observamos um aumento de expressão de proteínas de hemoglobina tipo 2. A proteína temptina (potencial feromônio com efeito atrativo) foi encontrada teve um aumento de expressão em caramujos infectados, sendo possível que provoque um desvio de recursos energéticos para a reprodução em detrimento do sistema imune. Diversas proteínas estruturais (como por exemplo a cadeia pesada de miosina dos músculos estriados ou da proteína não caracterizada LOC106059779 com domínio ADAM/reprolisina) tiveram expressão alterada, sugerindo que existe perda de tecido nos caramujos, isto pode ser tanto causado pelo parasita para migrar mais facilmente ou pode ser uma consequência da migração pelos tecidos. Aumento de fosfoglicerato mutase indica um aumento da glicólise, possivelmente para compensar alterações nas necessidades energéticas. O aumento da glicólise leva, conseqüentemente a um decréscimo de glicogênio particularmente nas reservas presentes nos complexo gonadal – glândula digestiva, que é compensado pelo aumento de outras vias metabólicas como a gluconeogênese (caracterizada pelo aumento das atividades de AST e ALT e dos níveis de uréia).

Palavras chave: *Biomphalaria glabrata*; *Angiostrongylus cantonensis*; proteômica; metabolismo

## Abstract

*Angiostrongylus cantonensis* is the main cause of human eosinophilic meningitis. Humans are accidental hosts, becoming infected due to raw ingestion of intermediate (snails and slugs) or paratenic hosts. Once ingested, the larvae migrate towards the brain where it dies causing the disease. Mollusk control is of great importance, since currently there is no treatment for this disease. To develop better control strategies understanding what happens in the snail during infection is extremely important, therefore our purpose was to characterize proteomic, metabolic and immunologic changes in *Biomphalaria glabrata* 24 h and 45 days after infection with *A. cantonensis*. For this purpose, proteins were extracted from snails (24 h after infection) with Tris-Urea buffer and digested with trypsin. Protein spectrums were obtained using a Thermo LTQ Orbitrap Velos and analyzed with MaxQuant and Perseus softwares. The hemolymph of five snails 24 h and 45 days after infection was collected, the number of hemocytes was counted in a Neubauer chamber and the levels of urea, uric acid, nitric oxide (NO), calcium, glycogen and alanine and aspartate aminotransferases (ALT and AST, respectively) activities were assessed. The snails were also dissected and both the cephalopodal region and gonad-digestive gland complex glycogen content was measured. After infection with *A. cantonensis*, we observed a significant increase of hemocytes and granulocytes as well as an increase in haemoglobin type 2 proteins. Temptine-like protein (its suggested that acts as a pheromone) was also found upregulated in infected snails, which would possibly represent in a deflection of energy resources from *B. glabrata* immune system towards reproduction. Several proteins with structural function (such as myosin heavy chain – striated muscle – like and uncharacterized protein LOC106059779 with ADAM/reprosolin domain) were also differentially expressed, suggesting loss/damage of internal tissues, either caused by the parasite to migrate easier or as a consequence of the migration through the tissues. Increase in phosphoglycerate mutase indicates an increase in glycolysis, possible to compensate the increase in energetic needs. As a consequence, there is a decrease in glycogen reserves, particularly in the gonad – digestive gland complex, which is then compensated through activation of other metabolic pathways such as gluconeogenesis (characterized by the increase of urea and ALT and AST activity).

Key words: *Biomphalaria glabrata*; *Angiostrongylus cantonensis*; proteomics; metabolism

## 1. Introdução

*Angiostrongylus cantonensis* é um nematódeo parasita que circula entre ratos e moluscos no seu ciclo de vida natural (Sauerlander, 1976; Wang et al., 2012). Nos seres humanos a infecção ocorre por ingestão de hospedeiros intermediários (diversos caramujos terrestres e aquáticos) ou paratênicos (Peixes, crustáceos, platelmintos de vida livre, sapos e rãs) crus ou mal cozidos (Espirito-Santo et al., 2013; Oehler et al., 2014). Após a ingestão, a larva do parasita migra para o cérebro onde morre, provocando meningite eosinofílica (Graeff-Teixeira et al., 2018; Wang et al., 2012).

*Biomphalaria glabrata* é o principal hospedeiro intermediário do parasita *Schistosoma mansoni* no Brasil, possuindo ampla distribuição pelo país. *A. cantonensis* não só tem capacidade de facilmente infectar este molusco em laboratório, como foram encontrados diversos espécimes naturalmente infectados com o parasita em diversas regiões do país (Morassutti et al., 2013; Morassutti et al., 2014; Thiengo et al., 2013).

Não existe fármaco que atue nesta parasitose, sendo apenas possível tratar a sintomatologia (Murphy and Johnson, 2013). A falta de tratamento aumenta a importância de desenvolver medidas de controle eficazes, principalmente na fase intramolusco, para isso é crucial entender as alterações que ocorrem no caramujo durante a infecção (Giannelli et al., 2016). Assim sendo, este trabalho teve como proposta avaliar alterações proteômicas, imunológicas e metabólicas de *B. glabrata* durante a infecção por *A. cantonensis*.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Parasitas e animais**

A manutenção do ciclo de vida de *A. cantonensis*, é realizada em ratos (*Ratus norvegicus*) linhagem Wistar (hospedeiro vertebrado) de 30 dias de idade e caramujos *B. glabrata* oriundos de Belo Horizonte (hospedeiro intermediário). Caramujos infectados foram separados das conchas, macerados, submersos em solução de pepsina (4 g de pepsina solubilizada em 1L de 230,4 mM de HCL) e incubados a 37°C por 2 h. As larvas foram isoladas em microscópio estereoscópico e os ratos foram infectados com 20 larvas L3 por gavagem.

O protocolo deste estudo (n° 4024-1) foi aprovado pelo comitê de ética para experimentação animal (CEEa) do Instituto de Biologia da Unicamp, e realizado de acordo com os princípios éticos adotados pela Associação Brasileira de Experimentação Animal (COBEA).

### **2.2. Infecção dos caramujos**

De ratos infectados com pelo menos 55 dias de infecção foram recolhidas fezes que foram maceradas e colocadas em uma peneira com gaze em contato com água a 42°C em cálice de sedimentação exposto a luz incandescente por 4 h. As larvas no sedimento foram isoladas e caramujos com aproximadamente 8 mm de diâmetro foram expostos individualmente a 50 larvas L1 por 16 h. Os caramujos foram mantidos em aquários de vidro com água decolorada, trocada semanalmente, e alimentados com alface duas vezes por semana.

## 2.3. Análise Proteômica

### 2.3.1. Preparo dos extratos proteicos e digestão em solução por tripsina

Foi homogeneizado individualmente o tecido de 3 moluscos infectados com *A. cantonensis* (24 h) (n=3) em tampão Tris-Uréia (50mM Tris pH 8.1, 75mM NaCl e 8M Uréia), inibidores de proteases e fosfatases. O homogenato foi centrifugado a 20.000 x g por 15 minutos a 4°C (Wu et al., 2014) e o conteúdo proteico do sobrenadante foi quantificado pelo método de Pierce (Pierce BCA Protein Assay Kit -Thermo Scientific, Rockford, USA). Foram precipitadas 150 µg de proteínas com acetona numa proporção 4:1 (vol:vol) incubadas a -20°C por 2 h e centrifugadas a 24000 g por 10 min a 4°C. O precipitado proteico foi dissolvido em 20 µL de Urea (8 M), o pH foi medido (entre 7 e 8), reduzido com 5mM (concentração final) de Dithiothreitol (DTT) e incubado a 56°C por 30 minutos. Em seguida as amostras foram alquiladas com 14 mM (contração final) de iodoacetamida (IAA) e incubadas no escuro a temperatura ambiente por 15 min. As amostras foram diluídas na proporção de 1:5 com 50 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, digeridas com tripsina (Promega) na proporção 1:50 (Enzima:Substrato) e incubadas a 37°C por 16 h. Realizada a digestão por tripsina e as amostras foram dessalinizadas em colunas do tipo OASIS (Waters), evaporadas em *speed vac* e estocadas a -20°C até a análise por espectrometria de massas.

### 2.3.2. Espectrometria de Massa

50 µg de proteínas foram injetadas em pré-coluna Thermo EASY C18-A1, 2cm (L) x 100 µm (D.I) x 5 µm x 120 Å e separadas em coluna Thermo EASY C18-A2, 10cm (L) x 75 µm (D.I) x 3 µm x 120 Å. A aquisição de dados foi realizada utilizando um Thermo Easy n-LC II acoplado a um espectrômetro de massas Thermo LTQ Orbitrap Velos (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). A eluição foi realizada com água milli-Q (0,1% ácido fórmico, Sigma) (Fase A) e acetonitrila grau massas (0,1% ácido fórmico) adquiridos da Sigma-Aldrich (Fase B), com eluição no modo gradiente, com tempo total de aquisição de dados de 135 minutos, com fluxo de 0,2 µL/minuto. A espectrometria de massa foi realizada no laboratório de Bioanalítica, Microfabricação e Separações – BioMics, do professor Dr. Emanuel Carrilho do Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo.

### 2.3.3. Análise proteômica

O software MaxQuant foi utilizado para análise dos espectros MS/MS (raw data) obtidos por Quantificação *Label Free* (LFQ) (Cox and Mann, 2008). Para realização das

buscas proteicas foram utilizadas 3 bases de dados de *B. glabrata* (NCBI - [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov); Uniprot – [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org); vectorbase – [www.vectorbase.org](http://www.vectorbase.org)). A tolerância de massa para os íons percursores foi 4,5 ppm e 20 ppm para fragmentos de íons. Selecionou-se oxidação da metionina e N-acetilação como modificações fixas e carbamidometil como modificação variável. Apenas se consideraram peptídeos com 3 peptídeos únicos identificados. A análise dos grupos proteicos resultantes foi realizada com o *software* Perseus (versão 1.5.2.6) (Tyanova et al., 2016). Após filtrar os contaminantes (*valid for at least 3 samples of one group*), analisou-se a qualidade dos dados (*multi-scatter plots* e *hierarchical clustering*). Para analisar a expressão proteica de proteínas com  $p\text{-value} < 0.05$  (*T-student*) e diferença de expressão de 0.5 (50%) entre grupos infectados e não infectados foram selecionadas. Para análise de Gene Ontology (GO) (Função molecular, Componente celular e Processos biológicos) de proteínas diferencialmente expressas, utilizando as suas sequências, foi realizada uma busca na base de dados vectorbase para identificar os domínios/famílias das proteínas e respectivos GOs.

## **2.4. Análise da hemolinfa**

A análise de alterações imunológicas e metabólicas foi realizada utilizando a hemolinfa. A hemolinfa foi coletada de 5 caramujos escolhidos de forma aleatória 24 h e 45 dias após a infecção (pi). A hemolinfa foi analisada individualmente e cada medida realizada 2 vezes.

### **2.4.1. Contagem de hemócitos**

O sistema de defesa interno do caramujo inclui duas populações de células efectoras de hemócitos, os granulócitos (atividade fagocitária) e os hialinócitos, assim como uma diversidade de fatores solúveis na hemolinfa que estão envolvidos no reconhecimento de patógenos e na resposta anti-inflamatória (Coustau et al., 2015; Giannelli et al., 2016).

Foi utilizada uma câmara Neubauer para a contagem de hemócitos em 10 µL de hemolinfa diluída (1/10) em tampão CBSS (Chernin Balanced Salt Solution – 48 mM NaCl, 2,0 mM KCl, 0,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3,6 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,6 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 mM glucose e 3 mM threalose, pH 7,4) com 0.5% de vermelho neutro. Hemócitos corados de vermelho foram considerados granulócitos (Martins-Souza et al., 2003).

### 2.4.2. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) e os seus intermediários reativos são produzidos pelos hemócitos durante infecção, desempenhando um papel importante na resposta de defesa de moluscos contra agentes patogênicos (Pereira et al., 2006).

NO foi estimado indiretamente por quantificação dos níveis de nitrito utilizando a reação de Griess. Para tal, homogeneizou-se 10 µL de hemolinfa, 100 µL de reagente de Griess e 100 µL de ácido tricloroacético (10%). A solução foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 3000 g por 5 minutos. 200 µL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços e a absorbância foi medida num espectrofotômetro a 600 nm. A quantidade de nitrito foi estimada contra uma curva padrão de NaNO<sub>2</sub> e expresso em nM (Pereira et al., 2006).

### 2.4.3. Ácido Úrico

As alterações metabólicas provocadas durante a infecção por parasitas podem levar à desaminação de aminoácidos alterando os níveis de ureia e ácido úrico (Tunholi-Alves et al., 2012).

Para determinar a concentração de ácido úrico, 4 µL de hemolinfa foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços, seguido da adição de 196 µL de reagente de coloração (Laborclin, Brasil – 50 mM de tampão fosfato, 200 U/L de uricase, 1000 U/L de peroxidase, 0,30 mM de 4-Aminofenazona e 4 mM de 2-amino-3.5 ácido diclorobenzoico). Após homogeneização a placa foi incubada a 37°C por 5 minutos. A leitura foi realizada a 490 nm em um espectrofotômetro e a quantidade de ácido úrico foi estimada contra uma curva padrão sendo os resultados expressos em µg/µL (Sanders et al., 1980).

### 2.4.4. Uréia

A concentração de uréia foi determinada misturando 1 µL de hemolinfa com 100 µL de tampão uréase (19,1 mM de tampão fosfato, 59,3 mM de salicilato de sódio, 3,2 mM de nitroprussido de sódio e 13,4 kU/L uréase - Labtest). Após homogeneização e incubação (37°C por 5 min) foram adicionados 100 µL de solução oxidante (2,7 M de hidróxido de sódio, 115 mM de hipoclorito de sódio) e as placas foram incubadas por mais 5 minutos a 37°C. As placas foram lidas em um espectrofotômetro (600nm) e a concentração foi estimada contra uma curva padrão de ureia, sendo os resultados expressos em µg/µL (Searcy et al., 1967).



#### 2.4.5. Atividade das aminotransferases

Em situações de estresse ocorre uma diminuição proteica em *B. glabrata* devido à desaminação de aminoácidos. Esta depleção pode ser detectada pelo aumento da atividade da alanina-aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), enzimas estas que catalisam a transferência de grupos aminas dos aminoácidos estabelecendo ligação entre o metabolismo de carboidratos e o metabolismo de aminoácidos/proteínas (Tunholi-Alves et al., 2012).

A atividade das aminotransferases foi determinada utilizando 16,1 µL de substrato para ALT ou AST (solução contendo 0,2 M L-alanina ou 0,2 M L-aspartato; 0,002 M acetoglutarato e 0,1 M tampão sódio fosfato, pH 7,4) (incubado a 37 °C durante 2 min), aos quais foram adicionados 6,5 µL de hemolinfa. Após homogeneização e incubação (37°C, 30 min), foram adicionados 16,1 µL de 0,001 M 2,4 dinitrofenilhidrazina e mantidos a 25 °C durante 20 min. A reação foi parada adicionando 161,3 µL de 0,4 M NaOH e as placas foram lidas em um espectrofotômetro a 490 nm sendo os resultados expressos em U/mL (Tunholi-Alves et al., 2012).

#### 2.4.6. Concentração de glicogênio

Durante infecção o parasita se alimenta dos nutrientes presentes no hospedeiro e libera produtos de excreção/secreção, provocando alterações metabólicas no caramujo. Estas alterações metabólicas podem levar a um aumento das necessidades energéticas do caramujo diminuindo níveis de glicogênio (Faro et al., 2013).

A concentração de glicogênio foi determinada homogeneizando 13 µL de hemolinfa em 53 µL de fenol 5%. Em seguida foram adicionados 133 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98%, a solução foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e seguida de outra incubação a 30°C por 20 min. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro a 490 nm, a concentração foi estimada contra uma curva padrão de glicogênio e os resultados expressos em µg/µL (Lo et al., 1970).

#### 2.4.7. Concentração de cálcio

O cálcio no caramujo é um componente essencial tanto no metabolismo como no sistema imune do caramujo. A sua concentração na hemolinfa foi medida com base no princípio de que a complexona O-cresolftalaina reage com cálcio em meio alcalino formando um complexo de cor púrpura (Chilcote and Wasson, 1958). Para isso 4  $\mu\text{L}$  de hemolinfa foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços sendo em seguida adicionada uma solução contendo 0,08 mM de complexona O-cresoftaleína e 4,5 mM de 8-hidroxiquilona (Laborclin). Após homogeneização, as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 minuto e medidas a 600 nm em um espectrofotômetro. A concentração de cálcio foi estimada contra uma curva de  $\text{CaCO}_3$  e expressa em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

## **2.5. Quantificação de glicogênio nos tecidos**

A região cefalopodal e o complexo gonadal – glândula digestiva 5 caramujos (selecionados de forma aleatória 24 h e 45 pi) foram dissecadas em gelo evitando metabolização de carboidratos por ação enzimática. Os tecidos foram pesados e homogeneizados em ácido tricloroacético (10%) (10 mL por grama de tecido) e centrifugados a 2000 g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em papel Whatman nº1, etanol gelado foi adicionado na proporção 2:1 seguido de incubação em gelo por 15 minutos e centrifugado a 2000 g por 10 minutos a 4 °C. Após descarte do sobrenadante ressuspendeu-se o *pellet* em 1 mL de HCl (1 M) (hidroxilação do glicogênio) e incubou-se a 100 °C por 30 minutos (Pinheiro et al., 2001). Para quantificação do glicogênio, neutralizou-se o pH com 1 M de NaOH, e 33  $\mu\text{L}$  de glicogênio extraído foram homogeneizados em 33  $\mu\text{L}$  de fenol 5%. Em seguida adicionou-se 133  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98%, incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente e seguido de outra incubação (30°C por 20 min). As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro a 490 nm, a concentração foi estimada contra uma curva padrão de glicogênio e os resultados expressos em  $\mu\text{g}$  de glicogênio /mg de tecido húmido (wt) (Lo et al., 1970).

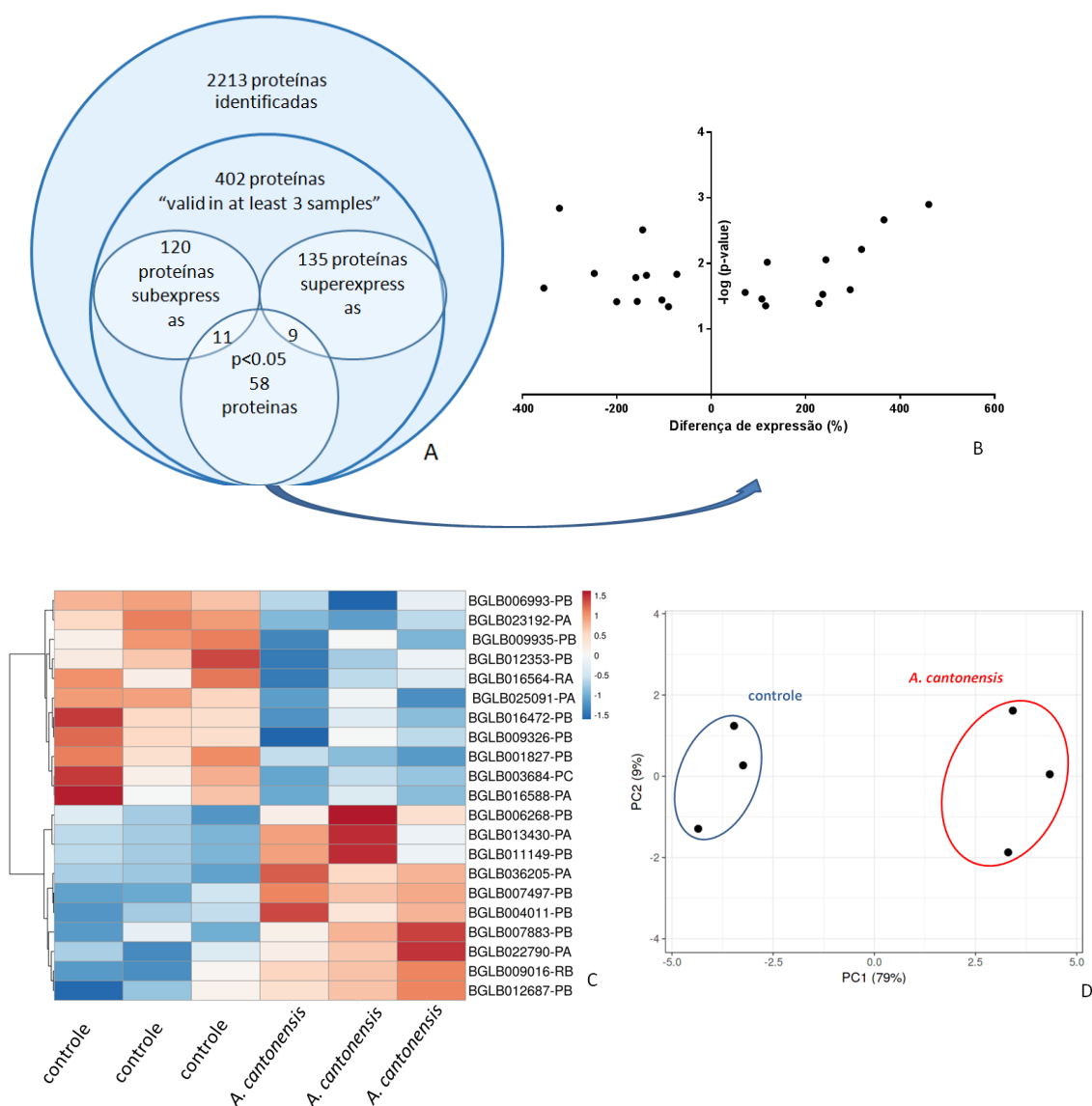
## **2.6. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o *software* GraphPad Prism. Análise de Variância (ANOVA) foi utilizada para identificar a presença de diferenças estatisticamente significativas entre grupos, onde  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

# **3. Resultados**

## **3.1. Análise proteômica**

Utilizando o *software* MaxQuant e Perseus (Cox and Mann, 2008; Tyanova et al., 2016) total de 2213 proteínas foram identificadas, das quais 402 foram consideradas como “válidas em pelo menos 3 amostras de um grupo”. De 402 proteínas foram selecionadas as proteínas com *p-value* inferior a 0,05 (*T-student*) e cuja diferença de expressão fosse de 0.5 (50%) entre grupos, resultando em 9 proteínas com expressão aumentada (Tabela 1) e 11 proteínas com expressão diminuída (Tabela 2) (Figura 3).

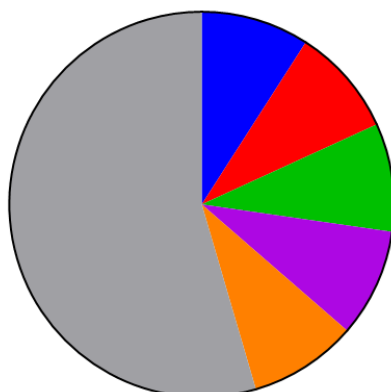


**Figura 1** – Visão geral de peptídeos e proteínas identificadas neste estudo: (A) Diagrama de Venn (Microsoft®Powerpoint) das proteínas identificadas e quantificadas; (B) Representação gráfica das proteínas significativas e com expressão diferenciada (GraphPad Prism 7); (C) *Heatmap* das proteínas significativas e com expressão diferenciada (ClustVis); (D) Análise de componentes principais (PCA) (ClustVis).

### 3.2. Ontologia Gênica (Gene Ontology – GO)

O processo biológico (GO) mais comum em proteínas com expressão diminuída foi processo metabólico de carboidratos (GO:0005975 - endoglucanase *A-like* e endo-1,4-beta-xilanase *A-like*) (Figura 2). Relativamente à função molecular (GO) (Figura 3) as mais comuns entre as proteínas com expressão aumentada foi ligação do íon cálcio (GO:0005509- cadeia leve da miosina essencial do músculo estriado adutor e proteína não caracterizada LOC106072068), enquanto nas proteínas com expressão diminuída as funções moleculares mais comuns foram ligação de DNA (*DNA binding*) (GO:0003677- fator de transcrição RFX4-like; Histona 4) e ligação de ATP (*ATP binding*) (GO:0005524 – Proteína *heat shock* 83-like e cadeia pesada de miosina dos músculos estriados isoforme X4) e actividade de hidrolase (GO:0004553 – endoglucanase *A – like* e endo-1,4 – beta-xilanase *A-like*). Em proteínas com expressão diminuída, foram encontrados os GOs dos componentes celulares de 5 proteínas, no entanto, em proteínas com expressão aumentada não foi encontrado nenhum GO de componente celular (Figure 4).

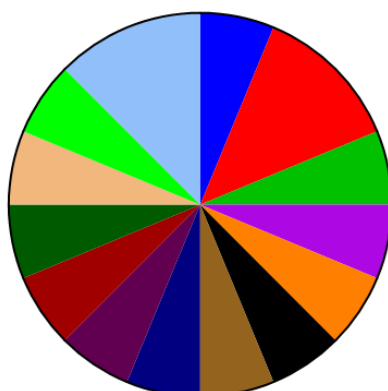
**Processo Biológico (GO) –Proteínas com Expressão aumentada**



- 9.09% GO:0006508 proteolysis
- 9.09% GO:0055114 oxidation-reduction process
- 9.09% GO:0022900 electron transport chain
- 9.09% GO:0006096 glycolytic process
- 9.09% GO:0006099 tricarboxilic acid cycle
- 54.55% Sem informação

A

**Processo Biológico (GO) –Proteínas com Expressão diminuída**

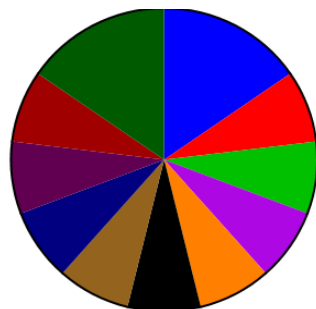


- 6.25% GO:0000413 protein peptidyl-prolyl isomerization
- 12.50% GO:0005975 carbohydrate metabolic process
- 6.25% GO:0006006 glucose metabolic process
- 6.25% GO:0006334 nucleosome assembly
- 6.25% GO:0006352 DNA-templated transcription, initiation
- 6.25% GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated
- 6.25% GO:0006457 protein folding
- 6.25% GO:0006730 one-carbon metabolic process
- 6.25% GO:0006816 calcium ion transport
- 6.25% GO:0006950 response to stress
- 6.25% GO:0055085 transmembrane transport
- 6.25% GO:0055114 oxidation-reduction process
- 6.25% GO:0098656 anion transmembrane transport
- 12.50% Sem informação

B

**Figura 2** – Processos biológicos (GOs) de proteínas com expressão diminuída (A) e com expressão aumentada (B) após infecção por *A. cantonensis*.

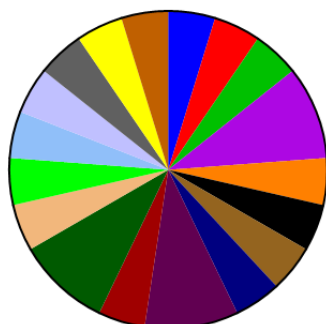
### Função Molecular (GO) –Proteínas com Expressão aumentada



- 15.38% GO:0005509 calcium ion binding
- 7.69% GO:0004222 metalloendopeptidase activity
- 7.69% GO:0008237 metallopeptidase activity
- 7.69% GO:0050660 flavin adenine dinucleotide binding
- 7.69% GO:0016627 oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors
- 7.69% GO:0016491 oxidoreductase activity
- 7.69% GO:0020037 heme binding
- 7.69% GO:0019904 protein domain specific binding
- 7.69% GO:0016868 intramolecular transferase activity, phosphotransferases
- 7.69% GO:0004619 phosphoglycerate mutase activity
- 15.38% Sem informação

A

### Função Molecular (GO) –Proteínas com Expressão diminuída

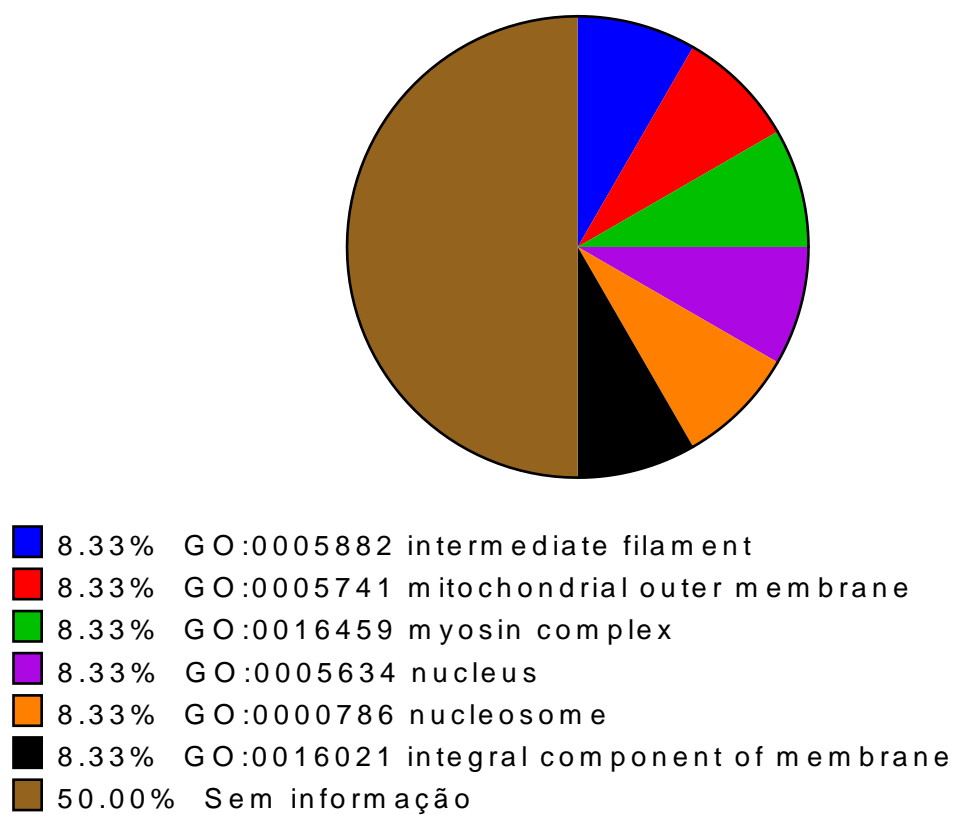


- 4.76% GO:0005198 structural molecule activity
- 4.76% GO:0000166 nucleotide binding
- 4.76% GO:0003676 nucleic acid binding
- 9.52% GO:0003677 DNA binding
- 4.76% GO:0003755 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity
- 4.76% GO:0003774 motor activity
- 4.76% GO:0003824 catalytic activity
- 4.76% GO:0004013 adenosylhomocysteinase activity
- 9.52% GO:0004553 hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
- 4.76% GO:0005388 calcium-transporting ATPase activity
- 9.52% GO:0005524 ATP binding
- 4.76% GO:0008308 voltage-gated anion channel activity
- 4.76% GO:0016620 oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor
- 4.76% GO:0016798 hydrolase activity, acting on glycosyl bonds
- 4.76% GO:0046982 protein heterodimerization activity
- 4.76% GO:0050661 NADP binding
- 4.76% GO:0051082 unfolded protein binding
- 4.76% GO:0051287 NAD binding

B

**Figura 3** – Função Molecular (GOs) de proteínas com expressão aumentada (A) e com expressão diminuída (B) após infecção por *A. cantonensis*

### Componente Celular (GO) - Proteínas com Expressão diminuída



**Figura 4** – Componente celular (GOs) de proteínas com expressão diminuída após infecção por *A. cantonensis*

**Tabela 1** – Proteínas com expressão aumentada em *B. glabrata* 24 h após a infecção por *A. cantonensis*.

VectorBaseID	$-\log(p\text{-value})$	Diferença de expressão	Nome da Proteína	Peptídios	Peptídios Únicos	Cobertura da sequência [%]	MW [kDa]	Score
BGLB007497-PB	2.899	4.603	Cadeia leve de miosina essencial, músculo estriado <i>adutor-like</i>	9	9	677	18228	48114
BGLB036205-PA	2.663	3.654	Proteína não caracterizada LOC106059779	8	8	377	51342	32331
BGLB009016-RB	1.599	2.940	<i>temptina-like</i> isoforme X2	6	6	389	14035	81552
BGLB022790-PA	1.528	2.359	Proteína não caracterizada LOC106072068	4	4	31	14912	32331
BGLB006268-PB	1.388	2.278	Oxiredutave putativa não caracterizada C513.07	5	5	229	47577	24955
BGLB012687-PB	1.353	1.150	succinato desidrogenase [ubiquinona] flavoproteína subunidade, mitocondrial- <i>like</i>	20	20	446	73092	25293
BGLB013430-PA	1.457579	1.070	hemoglobina tipo 2	107	11	76	15837	32331
BGLB007883-PB	1.557535	0.716	14-3-3 epsilon- <i>like</i>	14	14	578	29234	24555
BGLB004011-PB	2.054427	2.425	fosfoglicerato mutase	10	10	689	2859	67236

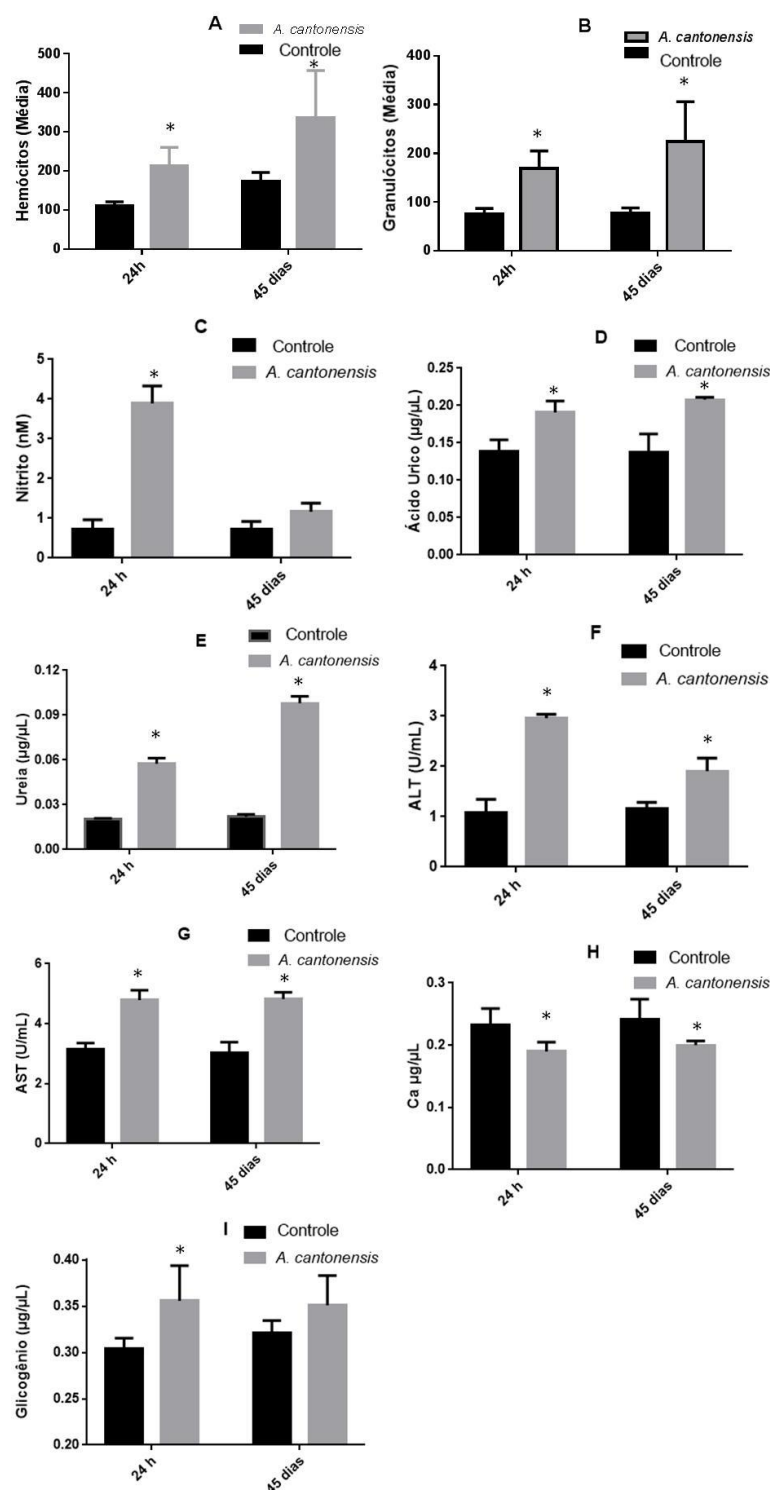


**Tabela 2** – Proteínas com expressão diminuída em *B. glabrata* 24 h após a infecção por *A. cantonensis*.

VectorBaseID	$-\log(p\text{-value})$	Diferença de expressão	Nome da Proteína	Peptídios	Peptídios únicos	Cobertura da sequência [%]	MW [kDa]	Score
BGLB016472-PB	1.834	0.730	Proteína retrograde de 51 kDa	58	57	861	65281	32331
BGLB009326-PB	1.340	0.908	gliceraldeído-3-fosfate desidrogenase- <i>like</i>	21	21	824	3194	32331
BGLB012353-PB	1.443	1.046	adenosilhomocisteinase- <i>like</i>	6	6	258	45364	24489
BGLB003684-PC	1.818	1.373	proteína seletiva de aníons dependente de voltagem 2- <i>like</i> isoforme X4	7	7	337	30659	13722
BGLB001827-PB	2.5119	1.454	Proteína <i>heat shock</i> 83- <i>like</i>	17	17	327	83458	1748
BGLB016588-PA	1.419	1.571	Cadeia pesada de miosina, músculo estriado- <i>like</i> isoforme X4	15	15	645	19552	32331
BGLB006993-PB	1.784	1.599	Fator de transcrição RFX4- <i>like</i>	6	6	159	5484	2639
BGLB009935-PB	1.415	2.004	endoglucanase A- <i>like</i>	6	4	236	50634	4226
BGLB023192-PA	2.841	3.217	endo-1,4-beta-xilanase A- <i>like</i>	10	10	196	87938	75026
BGLB025091-PA	1.847	2.480	Histona H4	9	9	592	11367	43205
BGLB016564-RA	1.623	3.547	ATPase de cálcio do retículo sarcoplásmico/endoplásmico 1- <i>like</i>	18	18	324	10866	14214

### **3.3. Análise hemolinfa**

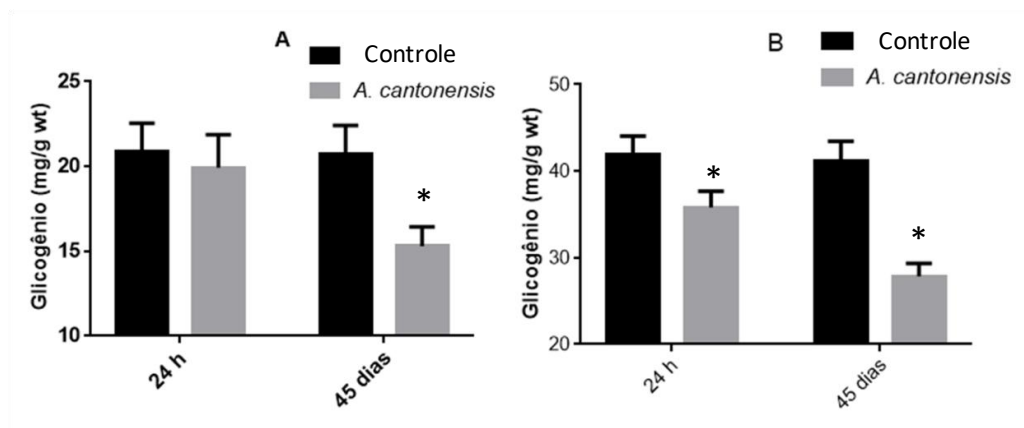
O número de hemócitos e granulócitos circulantes foi significativamente maior após 24 h e 45 dias pi comparando com o grupo não infectado ( $p < 0,05$ ) (Figura 5 – A e B). Os níveis de ácido úrico e uréia (Figura 5 – D e E) e a atividade das aminotransferases (ALT e AST) (Figura 5 – F e G) foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em caramujos com 24 h e 45 dias de infecção. Nitrito e glicogênio apresentaram um aumento significativo na hemolinfa 24 h pi (Figura 5 – C e I). A concentração de cálcio na hemolinfa (Figura 5 – H) foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) 24h e 45 dias após infecção comparando com caramujos não infectados.



**Figura 5** – Análise da hemolinfa de *B. glabrata* com 24 h (n=5) ou 45 dias (n=5) de infecção com *A. cantonensis* e respetivo controle não infectado (n=5). (A) Número médio de hemócitos; (B) número médio de granulócitos; (C) conteúdo de nitrito da hemolinfa (nM); (D) conteúdo de ácido úrico na hemolinfa (µg/µl); (E) conteúdo de uréia na hemolinfa (µg/µl); (F) Atividade de ALT (U/mL); (G) Atividade de AST (U/mL); (H) conteúdo de cálcio na hemolinfa (µg/µl); (I) conteúdo de glicogênio na hemolinfa (µg/µl). \*tem diferença significativa comparando com o grupo não infectado (*One-way ANOVA*,  $p < 0.05$ ).

### 3.4. Conteúdo de glicogênio nos tecidos

O conteúdo de glicogênio foi significativamente menor na região cefalopodal 45 dias pi após a infecção com *A. cantonensis*, não mostrando diferença significativa após 24 h (Figura 6 – A). No complexo glândula digestiva – gônada a concentração de glicogênio foi significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) tanto 24 h e 45 dias pi (Figura 6 – B).



**Figura 6** – Quantificação de hemolinfa nos tecidos de *B. glabrata* 24 h (n=5) e 45 dias (n=5) após a infecção por *A. cantonensis* e respectivo grupo controle não infectado (n=5). (A) conteúdo de glicogênio da região cefalopodal; (B) conteúdo de glicogênio do complexo gonadal – glândula digestiva. \*tem diferença significativa comparando com o grupo não infectado (One-way ANOVA,  $p < 0.05$ ).

## 4. Discussão

*B. glabrata* possui um sistema de resposta imune complexo e diversificado (Bayne, 2009). Os hemócitos, particularmente os granulócitos com atividade fagocítica, são as principais células efectoras deste sistema. Durante a infecção por *A. cantonensis* observamos um aumento significativo dos hemócitos e granulócitos e também observamos a aumento na expressão de proteínas de hemoglobina tipo 2.

A proteína temptina foi encontrada com expressão aumentada em caramujos infectados. Pensa-se que esta proteína atua como um feromônio em *B. glabrata*. Embora não se saiba ao certo como funciona foi demonstrado que atua como um atrativo para o caramujo (Pila et al., 2017). Este aumento pode explicar, em parte, o aumento significativo de ovos previamente descrito (Capítulo I) em caramujos infectados com *A. cantonensis*. Outra proteína com expressão aumentada foi a cadeia leve de miosina dos músculos adutores. O aumento desta proteína nos músculos adutores está geralmente associado com um aumento de locomoção (Pivovarov et al., 2014). Considerando o aumento da proteína temptina, é possível

que o aumento da miosina nos músculos adutores esteja relacionado com estímulo de reprodução levando o caramujo a se locomover mais em busca de outros moluscos com o intuito de se reproduzir. Também é possível que o aumento de miosina dos músculos adutores ocorra pôr o caramujo estar em situação de estresse, sendo vantajoso aumentar a locomoção com o intuito de se deslocar do local da infecção. É interessante verificar que embora haja um aumento nas proteínas de cadeia leve de miosina nos músculos adutores, houve diminuição da expressão protéica da cadeia pesada de miosina dos músculos estriados em geral, possivelmente isto ocorra devido a uma diminuição da miosina na musculatura visceral estriada (Plesch, 1977). Esta hipótese também é suportada pela quantificação de glicogênio, uma vez que o músculo estriado é particularmente rico em glicogênio (Pivovarov et al., 2014; Plesch, 1977; Stewart et al., 1985). Grande parte dos músculos estriados adutores encontram-se na região cefalopodal, enquanto o músculo estriado visceral se encontra em grande parte na seção do complexo gonadal – glândula digestiva (Lemos, 1999; Plesch, 1977). Assim sendo, a significativa diminuição de glicogênio na seção do complexo gonodal – glândula digestiva e ausência de diferenças significativas na região cefalopodal após a infecção suporta, em parte, a diminuição de músculo estriado visceral em oposição ao aumento de miosina nos músculos adutores presentes na região cefalopodal. A diminuição de músculo estriado visceral pode ainda explicar a diminuição de ATPase de cálcio do retículo sarcoplásmico/endoplásmico 1-like (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1-like*), dado que esta proteína é um regulador chave na performance do músculo estriado contribuindo no sequestro de cálcio envolvido na excitação/contração da musculatura (Nelson et al., 2016). Como e porque ocorre esta diminuição na musculatura visceral é desconhecido, contudo, esta diminuição poderia facilitar a penetração do parasita pelos tecidos. Além da perda de miosina visceral também ocorre diminuição da proteína retrograde de 51 kDa, uma proteína estrutural (GO:0005198 – atividade de molécula estrutural) e há um aumento da proteína LOC106059779, uma proteína com um domínio Peptidase M12B, ADAM/reprolisina que atua na morfogênese/remodelação de tecidos e cujo aumento de expressão é considerado vantajoso para o parasita, degradando a matriz protéica endógena do hospedeiro, facilitando o movimento do parasita pelos tecidos do caramujo (Wu et al., 2017). O movimento do parasita pelos tecidos leva ao depósito de cálcio da hemolinfa nos tecidos em resposta às reações inflamatórias provocadas pelo parasita (Tunholi-Alves et al., 2014). Além disso, diminuição dos níveis de cálcio na hemolinfa de caramujos infectados pode ser causada pela absorção do íon pelo parasita e também pela obtenção de energia pelo caramujo através de reações oxidativas catalisadas por enzimas que utilizam o cálcio como cofator (Mostafa, 2007; Tunholi-Alves et al., 2014).

Endoglucanase *A-like* e endo-1, 4 – beta – xilanase *A-like* são proteínas que, respectivamente, quebram celulose (em monossacarídeos como a  $\beta$ -celulose) e hemicelulose (um dos principais componentes da parede celular) (Behera et al., 2017; Sharma et al., 2018). Seria esperado que estas proteínas estivessem expressão aumentada para maior degradação de alimento compensando perdas de energia, contudo, em caramujos infectados com *A. cantonensis*, estas proteínas estavam com expressão diminuída. Esta alteração talvez ocorra pelo estímulo provocado pelo aumento de temptina, levando a que o caramujo dê prioridade à reprodução em detrimento da busca por alimento.

É muito provável que o aumento de fosfoglicerato mutase (enzima catalisadora da oitava etapa da glicólise) em caramujos infectados com *A. cantonensis* esteja relacionado com o aumento da glicólise para compensar o aumento de necessidade energética (Berg et al., 2002). Também é provável que ocorra um aumento na gluconeogenese para compensar a diminuição de reservas de glicogênio (Mello-Silva et al., 2010). O aumento da atividade das aminotransferases confirma a existência de um aumento na gluconeogênese, uma vez que AST e ALT são enzimas que desempenham um papel importante nesta via, onde ocorre a desaminação de aminoácidos (Pinheiro et al., 2001). O aumento da proteína succinato desidrogenase, também aponta para o aumento de produção de energia, esta enzima participa no ciclo do ácido tricarboxílico, ciclo este que tem como função a liberação de energia armazenada por oxidação de acetil-coenzima-A de carboidratos e proteínas (Silva et al., 2017). A degradação de proteínas e aminoácidos usados nestas vias leva a um acúmulo de produtos de nitrogênio, produtos tóxicos para o caramujo. Para lidar com este aumento o caramujo acelera a via da uréia, deixando de excretar amônia e passando a excretar uréia e ácido úrico, produtos menos tóxicos para o caramujo (Becker and Schmale, 1975; Souza et al., 2000).

Interessantemente foi observada uma diminuição de gliceraldeído – 3 – fosfato desidrogenase (GAPDH), esta enzima é principalmente conhecida por participar na glicólise catalisando a conversão de gliceraldeído – 3 – fosfato a D – gliceraldeído 1,3 bifosfato (Berg et al., 2002), contudo é possível que a diminuição de expressão não esteja associada com a glicólise, mas sim com o seu papel de iniciadora de apoptose. GAPDH é S-nitrosilada pôr NO ligando-se a uma ubiquitina ligase, sendo o complexo transportado para o núcleo da célula onde tem como alvo proteínas nucleares, degradando-as e iniciando a apoptose (Hara et al., 2005). Considerando o aumento de NO observado durante a infecção por *A. cantonensis* é possível que a diminuição de GAPDH seja uma tentativa do caramujo regular a morte celular.

A diminuição de expressão da proteína seletiva de ânions dependente de voltagem (*voltage-dependent anion-selective channel protein 2-like* – VADC2) também suporta que ocorre uma tentativa de controlar a morte programada, pois esta proteína também está envolvida na apoptose (Alvira et al., 2012; Subedi et al., 2011). Outra possibilidade da diminuição de VDCA2 é a tentativa de regular a produção de NO (que em níveis muito elevados também é tóxico para o caramujo), pois VDCAs regulam a enzima óxido nítrico sintase, crucial na produção de NO (Alvira et al., 2012).

Histona H4 foi encontrada com expressão diminuída após a infecção. A sua função exata durante a infecção do caramujo ainda é desconhecida, contudo sabe-se que as histonas têm um papel importante na remodelação da cromatina durante a mitose, atuam como receptores para vírus e bactérias na superfície celular, são componentes de armadilhas extracelulares e exercem atividade bactericida (Sandiford et al., 2015). Bouchut et al. (2006) reportaram a presença de histona H4 apenas em caramujos resistente a *Echinostoma caproni*, podendo a sua diminuição em caramujos infectados ser um indicativo do sucesso de infecção parasita.

A proteína 14-3-3 epsilon-like é uma proteína sinalizadora, encontrada com expressão aumentada em caramujos infectados com *A. cantonensis*. Pouca informação existe sobre qual o papel concreto desta proteína, porém ela tem sido caracterizada como tendo um papel importante na imunologia no contexto hospedeiro-parasita. (Wang et al., 2013).

Expressão aumentada de proteínas *Heat-shock-90* (HSP90) tem sido associada com resistência de *B. glabrata* a *S. mansoni* (Arican-Goktas et al., 2014; Sullivan, 2018). Neste trabalho caramujos infectados com *A. cantonensis* demonstraram sub expressão de proteína *Heat-shock* -83 (HSP83), proteína pertencente à família HSP90, sendo então possível que esteja implicada no sucesso de infecção pelo parasita.

É ainda importante referir que para confirmar se as proteínas encontradas pertenciam a *B. glabrata* e não a *A. cantonensis*, foi feita uma busca de proteínas utilizando o banco de dados de proteínas de *A. cantonesis*, não tendo sido encontradas proteínas significativas e assim confirmando que as proteínas analisadas pertenciam ao hospedeiro invertebrado.

## 5. Conclusão

Pouco se sabe de como o sistema imune de *B. glabrata* reage à infecção por parasitas e ainda menos sobre o que ocorre durante a infecção por *A. cantonensis*. Embora haja falta de dados no que refere à função específica das proteínas do caramujo, foi possível neste trabalho levantar algumas hipóteses de causas ou consequências das alterações do proteoma observadas após a infecção. Foi descrito que *S. mansoni* consegue controlar parte da resposta imune de *B. glabrata* por reposicionamento espacial de genes ativados (Arican-Goktas et al., 2014). Considerando as alterações encontradas neste trabalho em caramujos infectados com *A. cantonensis*, é provável que este parasita também tenha capacidade, direta ou indireta, de alterar a resposta imune do hospedeiro, seja por provocar um estímulo reprodutivo no caramujo, alterando a distribuição de gastos energéticos do caramujo priorizando a reprodução em detrimento do sistema imune ou, através de algum mecanismo, diminuindo a expressão de proteínas imunes e sinalizadoras como proteína 14-3-3 ou HSP83. Também foi observada uma diminuição de proteínas constituintes dos tecidos do caramujo, sendo possível que o parasita degrade estas proteínas ou diminua a sua expressão. Compreender o que ocorre dentro do caramujo durante infecção é extremamente importante para o desenvolvimento de estratégias que permitam o controle de parasitas ainda na fase intramolusco, prevenindo assim que populações humanas contraíam doença.

## 6. Referências

- Alvira, C.M., Umesh, A., Husted, C., Ying, L., Hou, Y., Lyu, S.-C., Nowak, J., Cornfield, D.N., 2012. Voltage-dependent anion channel-2 interaction with nitric oxide synthase enhances pulmonary artery endothelial cell nitric oxide production. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 47, 669-678.
- Arican-Goktas, H.D., Ittiprasert, W., Bridger, J.M., Knight, M., 2014. Differential spatial repositioning of activated genes in *Biomphalaria glabrata* snails infected with *Schistosoma mansoni*. *PLoS neglected tropical diseases* 8, e3013.
- Bayne, C.J., 2009. Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: a 2009 assessment. *Molecular and biochemical parasitology* 165, 8-18.



- Becker, W., Schmale, H., 1975. The nitrogenous products of degradation—Ammonia, urea and uric acid—In the hemolymph of the snail *Biomphalaria glabrata*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 51, 407-411.
- Behera, B.C., Sethi, B.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K., Thatoi, H.N., 2017. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 15, 197-210.
- Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L., 2002. Biochemistry, 5 Edition. W. H. Freeman and Company, New York.
- Bouchut, A., Sautiere, P.E., Coustau, C., Mitta, G., 2006. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: Potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach. Acta tropica 98, 234-246.
- Chilcote, M.E., Wasson, R.D., 1958. A new micro method for the colorimetric determination of calcium in serum or urine. Clinical chemistry 4, 200-210.
- Coustau, C., Gourbal, B., Duval, D., Yoshino, T.P., Adema, C.M., Mitta, G., 2015. Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade. Fish & Shellfish Immunology 46, 5-16.
- Cox, J., Mann, M., 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nature biotechnology 26, 1367-1372.
- Espirito-Santo, M.C., Pinto, P.L., Mota, D.J., Gryschek, R.C., 2013. The first case of *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis diagnosed in the city of São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 55, 129-132.
- Faro, M.J., Perazzini, M., Correa Ldos, R., Mello-Silva, C.C., Pinheiro, J., Mota, E.M., de Souza, S., de Andrade, Z., Junior, A.M., 2013. Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. Experimental parasitology 134, 228-234.
- Giannelli, A., Cantacessi, C., Colella, V., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2016. Gastropod-Borne Helminths: A Look at the Snail-Parasite Interplay. Trends in parasitology 32, 255-264.

- Graeff-Teixeira, C., Morassutti, A.L., Jones, M.K., 2018. Diagnosing and Understanding Angiostrongyliasis, A Zoonotic Cause of Meningitis. *ACS Chemical Neuroscience* 9, 393-394.
- Hara, M.R., Agrawal, N., Kim, S.F., Cascio, M.B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J.H., Tankou, S.K., Hester, L.D., Ferris, C.D., Hayward, S.D., Snyder, S.H., Sawa, A., 2005. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nature cell biology* 7, 665-674.
- Lemos, Q.T., 1999. Contribution to the histology of *Biomphalaria glabrata*. *Rev Soc Bras Med Trop* 32, 343-347.
- Lo, S., Russell, J.C., Taylor, A.W., 1970. Determination of glycogen in small tissue samples. *Journal of applied physiology* 28, 234-236.
- Martins-Souza, R.L., Pereira, C.A.J., Coelho, P.M.Z., Negrão-Corrêa, D., 2003. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. *Parasitology research* 91, 500-507.
- Mello-Silva, C.C., Vilar, M.M., Vasconcellos, M.C., Pinheiro, J., Rodrigues Mde, L., 2010. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 105, 492-495.
- Morassutti, A.L., Pereygin, A., MO, D.E.C., Lemos, L.N., Pinto, P.M., Frace, M., Wilkins, P.P., Graeff-Teixeira, C., AJ, D.A.S., 2013. High throughput sequencing of the *Angiostrongylus cantonensis* genome: a parasite spreading worldwide. *Parasitology* 140, 1304-1309.
- Morassutti, A.L., Thiengo, S.C., Fernandez, M., Sawanyawisuth, K., Graeff-Teixeira, C., 2014. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 109, 399-407.
- Mostafa, O.M., 2007. Effects of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infections on calcium content in their intermediate hosts. *Parasitology research* 101, 963-966.
- Murphy, G.S., Johnson, S., 2013. Clinical aspects of eosinophilic meningitis and meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*, the rat lungworm. *Hawai'i*

journal of medicine & public health : a journal of Asia Pacific Medicine & Public Health 72, 35-40.

Nelson, B.R., Makarewich, C.A., Anderson, D.M., Winders, B.R., Troupes, C.D., Wu, F., Reese, A.L., McAnally, J.R., Chen, X., Kavalali, E.T., Cannon, S.C., Houser, S.R., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2016. A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science (New York, N.Y.)* 351, 271-275.

Oehler, E., Ghawche, F., Delattre, A., Berberian, A., Levy, M., Valour, F., 2014. *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis: A clinical study of 42 consecutive cases in French Polynesia. *Parasitology international* 63, 544-549.

Pereira, C.A., Martins-Souza, R.L., Coelho, P.M., Lima, W.S., Negrao-Correa, D., 2006. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* susceptibility to *Schistosoma mansoni*. *Acta tropica* 98, 224-233.

Pila, E.A., Peck, S.J., Hanington, P.C., 2017. The protein pheromone temptin is an attractant of the gastropod *Biomphalaria glabrata*. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* 203, 855-866.

Pinheiro, J., Gomes, E.M., Chagas, G.M., 2001. Aminotransferases activity in the hemolymph of *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthonychidae) under starvation. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 96, 1161-1164.

Pivovarov, A.S., Murzina, G.B., Makhnovskii, D.A., Vasil'eva, N.A., Tret'yakova, M.S., 2014. The Role of Myosins in Depression of Neuron Sensitivity to Acetylcholine in a Cellular Analog of Habituation in the Common Snail. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 44, 1039-1045.

Plesch, B., 1977. An ultrastructural study of the musculature of the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Cell and tissue research* 180, 317-340.

Sanders, G.T.B., Pasman, A.J., Hoek, F.J., 1980. Determination of uric acid with uricase and peroxidase. *Clinica Chimica Acta* 101, 299-303.

Sandiford, S.L., Dong, Y., Pike, A., Blumberg, B.J., Bahia, A.C., Dimopoulos, G., 2015. Cytoplasmic Actin Is an Extracellular Insect Immune Factor which Is Secreted upon Immune Challenge and Mediates Phagocytosis and Direct Killing of Bacteria, and Is a *Plasmodium* Antagonist. *PLOS Pathogens* 11, e1004631.

Sauerlander, R., 1976. [Histological studies of the African giant snail (*Achatina fulica*) experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* or *Angiostrongylus cantonensis*]. Zeitschrift fur Parasitenkunde (Berlin, Germany) 49, 263-280.

Searcy, R.L., Reardon, J.E., Foreman, J.A., 1967. A new photometric method for serum urea nitrogen determination. The American journal of medical technology 33, 15-20.

Sharma, K., Antunes, I.L., Rajulapati, V., Goyal, A., 2018. Low-resolution SAXS and comparative modeling based structure analysis of endo-beta-1,4-xylanase a family 10 glycoside hydrolase from *Pseudopedobacter saltans* comb. nov. International journal of biological macromolecules 112, 1104-1114.

Silva, L.D., Amaral, V.C.S., Vinaud, M.C., Castro, A.M., Rezende, H.H.A., Santos, D.B., Mello-Silva, C.C., Bezerra, J.C.B., 2017. Changes in energetic metabolism of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae) in response to exogenous calcium. Brazilian Journal of Biology 77, 304-311.

Souza, R.M.d., Gomes, E.M., Chagas, G.M., Pinheiro, J., 2000. The influence of starvation and *Eurytrema coelomaticum* infection on the nitrogenous products of degradation in the hemolymph of *Bradybaena similaris*. Brazilian Archives of Biology and Technology 43, 0-0.

Stewart, G.L., Ubelaker, J.E., Curtis, D., 1985. Pathophysiologic alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Angiostrongylus costaricensis*. Journal of invertebrate pathology 45, 152-157.

Subedi, K.P., Kim, J.C., Kang, M., Son, M.J., Kim, Y.S., Woo, S.H., 2011. Voltage-dependent anion channel 2 modulates resting Ca(2)+ sparks, but not action potential-induced Ca(2)+ signaling in cardiac myocytes. Cell calcium 49, 136-143.

Sullivan, J.T., 2018. Reversal of Schistosome Resistance In *Biomphalaria glabrata* By Heat Shock May Be Dependent On Snail Genotype. Journal of Parasitology 104, 407-412.

Thiengo, S.C., Simoes Rde, O., Fernandez, M.A., Maldonado, A., Jr., 2013. *Angiostrongylus cantonensis* and rat lungworm disease in Brazil. Hawai'i journal of medicine & public health : a journal of Asia Pacific Medicine & Public Health 72, 18-22.

Tunholi-Alves, V.M., Tunholi, V.M., Garcia, J.S., Costa-Neto, S.F., Maldonado, A.J., Santos, M.A.J., Thiengo, S.C., Pinheiro, J., 2014. Changes in the calcium metabolism of

*Biomphalaria glabrata* experimentally infected with *Angiostrongylus cantonensis*. Journal of helminthology 88, 160-165.

Tunholi-Alves, V.M., Tunholi, V.M., Pinheiro, J., Thiengo, S.C., 2012. Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata*. Experimental parasitology 131, 143-147.

Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., 2016. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. 13, 731-740.

Wang, Q.P., Wu, Z.D., Wei, J., Owen, R.L., Lun, Z.R., 2012. Human *Angiostrongylus cantonensis*: an update. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 31, 389-395.

Wang, T., Van Steendam, K., Dhaenens, M., Vlamincx, J., Deforce, D., Jex, A.R., Gasser, R.B., Geldhof, P., 2013. Proteomic Analysis of the Excretory-Secretory Products from Larval Stages of *Ascaris suum* Reveals High Abundance of Glycosyl Hydrolases. PLoS neglected tropical diseases 7, e2467.

Wu, X.J., Dinguirard, N., Sabat, G., Lui, H.D., Gonzalez, L., Gehring, M., Bickham-Wright, U., Yoshino, T.P., 2017. Proteomic analysis of *Biomphalaria glabrata* plasma proteins with binding affinity to those expressed by early developing larval *Schistosoma mansoni*. PLoS Pathog 13, e1006081.

Wu, Y., Williams, E.G., Dubuis, S., Mottis, A., Jovaisaite, V., Houten, S.M., Argmann, C.A., Faridi, P., Wolski, W., Kutalik, Z., Zamboni, N., Auwerx, J., Aebersold, R., 2014. Multilayered genetic and omics dissection of mitochondrial activity in a mouse reference population. Cell 158, 1415-1430.

## Capítulo IV – Análise metabólica de *Biomphalaria glabrata* coinfectada com *Schistosoma mansoni* e *Angiostrongylus cantonensis*

### Resumo

No Brasil, *Biomphalaria glabrata* é o principal hospedeiro intermediário responsável pela transmissão de *Schistosoma mansoni*. *Angiostrongylus cantonensis* é a principal causa de meningite eosinofílica humana, embora sejam hospedeiros acidentais, se infectando ao ingerir os hospedeiros intermediários ou paratênicos crus. Após a ingestão, a larva migra para o cérebro onde morre causando a doença. O controle dos moluscos é de importância uma vez que não existe tratamento para esta doença. Uma vez que ambos parasitas são capazes de infectar o mesmo hospedeiro invertebrado, compreender o que acontece no caramujo durante a coinfecção seria importante no desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes. Assim sendo, o propósito neste trabalho foi caracterizar as alterações metabólicas e imunológicas em *Biomphalaria glabrata* 24h e 45 dias após a infecção (pi) por *S. mansoni* e *A. cantonensis*. Com este objetivo, foi coletado a hemolinfa dos caramujos 24 h e 45 dias após a infecção, os hemócitos foram contados em câmara de Neubauer e os níveis de uréia, ácido úrico, óxido nítrico (NO), cálcio, glicogênio e atividade de aspartato e alanina aminotransferases (AST e ALT, respectivamente) foram medidos. Os caramujos também foram dissecados e os níveis de glicogênio da região cefalopodal e do complexo gonadal – glândula digestiva foram quantificados. Foi observado aumento no número de hemócitos na hemolinfa 24 h pi, não sendo encontrada diferença significativa 45 dias pi, possivelmente devido à migração dos hemócitos para o local de infecção nos tecidos. Os níveis de óxido nítrico estavam mais elevados 24 h e 45 dias pi. A atividade de AST e ALT estava mais elevada nos caramujos infectados 24 h e 45 dias pi, aumento este, que juntamente com o aumento de uréia, aponta para um aumento da gluconeogênese, possivelmente para compensar a diminuição de glicogênio encontrada nos caramujos infectados. Os níveis de cálcio da hemolinfa também se encontravam diminuídos em caramujos infectados, possivelmente, não somente pelo seu uso em vias metabólicas do caramujo e do parasita, mas também pelo depósito do íon nos tecidos em locais de inflamação.

Palavras chave: *Biomphalaria glabrata*; *Schistosoma mansoni*; *Angiostrongylus cantonensis*; proteômica; metabolismo; coinfecção

### Abstract

In Brazil, *Biomphalaria glabrata* is the main intermediate host, responsible *Schistosoma mansoni* transmission. *Angiostrongylus cantonensis* is the main cause of human eosinophilic meningitis. Humans are accidental hosts, becoming infected due to raw ingestion of intermediate (snails and slugs) or paratenic hosts. Once ingested, the larvae migrate towards the brain where it dies causing the disease. Mollusk control is of great importance, since currently there is no treatment for this disease. Both parasites are capable of infecting *B. glabrata*. Understanding what happens inside the snail during coinfection would

aid the development of better control strategies. *B. glabrata* snails were infected with *A. cantonensis* and *S. mansoni* were sacrificed 24 h and 45 days post infection (pi). Hemolymph was collected as well as the cephalopodal region and gonoda-digestive gland complex. The number of hemocytes was counted and immunologic and metabolic changes were evaluated (nitric oxide, uric acid, alanine and aspartate aminotransferase activity, glycogen concentration and calcium levels). We found an increase in hemocytes 24 h after infection, however this increase was not observed at 45 dpi possibly due to migration to the place of infection in the tissues. Nitric oxide levels were higher 24 h and 45 days pi. Aminotransferases activity was higher 24 h and 45 dpi when compared with the control group, this increase, along with the increase in urea concentration, indicates an increase in gluconeogenesis, most likely to compensate the decrease of glycogen content found. Hemolymph calcium levels were also lower in infected snails probably due to the use of this ion in both the snail and parasite metabolism, as well as due to deposition in the place of infection.

**Key words:** *Biomphalaria glabrata*; *Schistosoma mansoni*; *Angiostrongylus cantonensis*; proteomics; metabolism; coinfection

## 1. Introdução

*Biomphalaria glabrata*, tem uma vasta distribuição no Brasil, estando presente nas regiões do Nordeste a Sudeste e na parte norte da região Sul do país (Scholte et al., 2012). *Schistosoma mansoni* e *A. cantonensis* são ambos capazes de utilizar *Biomphalaria glabrata* como hospedeiro intermediário, no entanto, embora tenham a possibilidade de infectar a mesma espécie de caramujo, a sua especificidade quanto ao hospedeiro intermediário difere. *S. mansoni* tem alta especificidade para o seu hospedeiro intermediário, infectando caramujos do gênero *Biomphalaria* (Giannelli et al., 2016) enquanto *A. cantonensis*, não demonstra especificidade de hospedeiro intermediário sendo capaz de infectar diversos moluscos terrestres e aquáticos (Guerino et al., 2009; Pereira et al., 2006; Thiengo et al., 2013).

A possibilidade de infecção do mesmo hospedeiro intermediário por duas espécies distintas de parasita, levanta também questões importantes, como se a presença de outro parasita debilita ainda mais o caramujo permitindo a infecção se estabelecer mais facilmente ou se ocorre estimulação do sistema imunitário ajudando no combate à infecção, ou ainda se ocorre uma competição de nutrientes entre os parasitas (Coustau et al., 2015; Guerino et al., 2009). Para entender estas questões o objetivo do trabalho foi caracterizar alterações imunológicas e metabólicas no caramujo na situação de coinfecção.

## 2. Material e Métodos

## 2.1. Parasitas e Animais

Utilizada a linhagem BH (Belo Horizonte) de *S. mansoni* e uma linhagem de *A. cantonensis*, mantidos no Grupo de Helminologia – Departamento de Biologia animal da Universidade de Campinas.

O ciclo de vida de *S. mansoni* é mantido em camundongos fêmeas (*Mus musculus*) da linhagem Swiss e caramujos *B. glabrata* de Belo Horizonte. Fezes de camundongos infectados foram coletadas, homogeneizadas em água gelada e filtradas por uma peneira com 0,150 mm. A eclosão dos miracídios foi estimulada por exposição dos ovos a luz incandescente. Os caramujos foram expostos individualmente a 8 miracídios por 8 h e após 45 dias os moluscos foram expostos a luz incandescente por 1 h para estímulo da liberação de cercárias. Os camundongos foram infectados por exposição individual da cauda imersa em água contendo 70 cercárias por um período de 2 h (Olivier and Stirewalt, 1952).

O ciclo de vida de *A. cantonensis* foi mantido em ratos (*Ratus norvegicus*) linhagem Wistar macho e caramujos *B. glabrata* de Belo Horizonte. Fezes de ratos infectados foram coletadas, maceradas e colocadas numa peneira com gaze. A peneira foi colocada em contato com água a 42°C em um cálice de sedimentação exposta a luz incandescente por 4 h. As larvas no sedimento foram coletadas e os moluscos foram expostos individualmente a 50 larvas L1 por 16 h. Após 50 dias os caramujos infectados foram eutanasiados e o corpo retirado da concha, macerados em solução de pepsina (4 g de pepsina solubilizada em 1L de 230,4 mM de HCL) e incubados a 37°C por 2 h. As larvas coletadas e ratos com 30 dias foram infectados com 20 larvas L3 por gavagem.

O protocolo deste estudo (n° 4024-1) foi aprovado pelo comitê de ética para experimentação animal (CEEa) do Instituto de Biologia da Unicamp, e realizado de acordo com os princípios éticos adotados pela Associação Brasileira de Experimentação Animal (COBEA).

## 2.2. Infecção dos grupos experimentais e coleta de hemolinfa

Para a infecção foram utilizadas 50 larvas (L1) de *A. cantonensis* obtidas como descrito anteriormente. Os moluscos com 8 mm de diâmetro foram individualmente expostos às larvas durante 16 h. Sendo em seguida individualmente expostos por 8 h a 8 miracídios de *Schistosoma mansoni* (BH). Os caramujos foram mantidos em aquários de vidro com água declorada, trocada semanalmente, e alimentados com alface duas vezes por semana.



### 2.3. Análise da hemolinfa

A hemolinfa foi coletada de 5 caramujos escolhidos de forma aleatória 24 h e 45 dias após a infecção (pi) e utilizada para análise de alterações imunológicas e metabólicas dos caramujos. As quantificações foram realizadas individualmente para cada caramujo.

#### 2.3.1. Contagem de hemócitos

*B. glabrata* tem duas populações de células efectoras de hemócitos, os granulócitos (atividade fagocitária) e os hialinócitos (Coustau et al., 2015; Giannelli et al., 2016). Os hemócitos foram contados em câmara Neubauer utilizando 10 µL de hemolinfa diluída (1/10) em tampão CBSS (Chernin Balanced Salt Solution – 48 mM NaCl, 2,0 mM KCl, 0,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3,6 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,6 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 mM glucose e 3 mM threalose, pH 7,4) com 0.5% de vermelho neutro. Hemócitos corados de vermelho foram considerados granulócitos (Martins-Souza et al., 2003).

#### 2.3.2. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) e os seus intermediários reativos são extremamente importantes na defesa imune dos caramujo (Pereira et al., 2006). Como tal, NO foi estimado indiretamente por quantificação dos níveis de nitrito utilizando a reação de Griess. Para tal, homogeneizou-se 10 µL de hemolinfa, 100 µL de reagente de Griess e 100 µL de ácido tricloroacético (10%). A solução foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 3000 g por 5 minutos. 200 µL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços e a absorbância foi medida num espectrofotômetro a 600 nm. A quantidade de nitrito foi estimada contra uma curva padrão de NaNO<sub>2</sub> e expresso em nM (Pereira et al., 2006).

#### 2.3.3. Ácido Úrico

A infecção por parasitas pode levar à desaminação de aminoácidos, que como consequência pode levar a alterações dos níveis de ureia e ácido úrico (Tunholi-Alves et al., 2012).

Para determinar a concentração de ácido úrico, 4  $\mu\text{L}$  de hemolinfa foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços, seguido da adição de 196  $\mu\text{L}$  de reagente de coloração (Laborclin, Brasil – 50 mM de tampão fosfato, 200 U/L de uricase, 1000 U/L de peroxidase, 0,30 mM de 4-Aminofenazona e 4 mM de 2-amino-3.5 ácido diclorobenzoico). Após homogeneização a placa foi incubada a 37°C por 5 minutos. A leitura foi realizada a 490 nm em um espectrofotômetro e a quantidade de ácido úrico foi estimada contra uma curva padrão sendo os resultados expressos em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Sanders et al., 1980).

#### **2.3.4. Uréia**

A concentração de uréia foi determinada misturando 1  $\mu\text{L}$  de hemolinfa com 100  $\mu\text{L}$  de tampão uréase (19,1 mM de tampão fosfato, 59,3 mM de salicilato de sódio, 3,2 mM de nitroprussido de sódio e 13,4 kU/L uréase - Labtest). Após homogeneização e incubação (37°C por 5 min) foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução oxidante (2,7 M de hidróxido de sódio, 115 mM de hipoclorito de sódio) e as placas foram incubadas por mais 5 minutos a 37°C. As placas foram lidas em um espectrofotômetro (600nm) e a concentração foi estimada contra uma curva padrão de uréia, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Searcy et al., 1967).

#### **2.3.5. Atividade das aminotransferases**

A desaminação de aminoácidos pode ser detectada pelo aumento da atividade da alanina-aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), enzimas estas que catalisam a transferência de grupos aminas dos aminoácidos estabelecendo ligação entre o metabolismo de carboidratos e o metabolismo de aminoácidos/proteínas (Tunholi-Alves et al., 2012). A atividade das aminotransferases foi determinada utilizando 16,1  $\mu\text{L}$  de substrato para ALT ou AST (solução contendo 0,2 M L-alanina ou 0,2 M L-aspartato; 0,002 M acetoglutarato e 0,1 M tampão sódio fosfato, pH 7,4) (incubado a 37 °C durante 2 min), aos quais foram adicionados 6,5  $\mu\text{L}$  de hemolinfa. Após homogeneização e incubação (37°C, 30 min), foram adicionados 16,1  $\mu\text{L}$  de 0,001 M 2,4 dinitrofenilhidrazina e mantidos a 25 °C durante 20 min. A reação foi interrompida adicionando 161,3  $\mu\text{L}$  de 0,4 M NaOH e as placas foram lidas em um espectrofotômetro a 490 nm sendo os resultados expressos em U/mL (Tunholi-Alves et al., 2012).

### 2.3.6. Concentração de glicogênio

Durante infecção os parasitas se alimentam dos nutrientes presentes no hospedeiro podendo levar a um aumento das necessidades energéticas do caramujo e diminuindo níveis de glicogênio (Faro et al., 2013).

A concentração de glicogênio foi determinada homogeneizando 13  $\mu\text{L}$  de hemolinfa em 53  $\mu\text{L}$  de fenol 5%. Em seguida foram adicionados 133  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98%, a solução foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e seguida de outra incubação a 30°C por 20 min. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro a 490 nm, a concentração foi estimada contra uma curva padrão de glicogênio e os resultados expressos em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Lo et al., 1970).

### 2.3.7. Concentração de cálcio

Em *B. glabrata*, o íon cálcio é um componente essencial no metabolismo e sistema imune. A sua concentração na hemolinfa foi medida com base no princípio de que a complexona O-cresolftalaina reage com cálcio em meio alcalino formando um complexo de cor púrpura (Chilcote and Wasson, 1958). Para isso 4  $\mu\text{L}$  de hemolinfa foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços sendo em seguida adicionada uma solução contendo 0,08 mM de complexona O-cresolftaleína e 4,5 mM de 8-hidroxiqnilona (Laborclin). Após homogeneização, as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 minuto e medidas a 600 nm em um espectrofotômetro. A concentração de cálcio foi estimada contra uma curva de  $\text{CaCO}_3$  e expressa em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

## 2.4. Quantificação de glicogênio nos tecidos

A região cefalopodal e o complexo gonadal – glândula digestiva de 5 caramujos (selecionados de forma aleatória 24 h e 45 pi) foram dissecadas em gelo evitando metabolização de carboidratos por ação enzimática. Os tecidos foram pesados e homogeneizados em ácido tricloroacético (10%) (10 mL por grama de tecido) e centrifugados a 2000 g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em papel Whatman n°1, etanol gelado foi adicionado na proporção 2:1 seguido de incubação em gelo por 15 minutos e centrifugado a 2000 g por 10 minutos a 4 °C. Após descarte do sobrenadante ressuspendeu-se o *pellet* em 1 mL de HCl (1 M) (hidroxilação do glicogênio) e incubou-se a 100 °C por 30 minutos (Pinheiro et al., 2001). Para quantificação do glicogênio, neutralizou-se o pH com 1

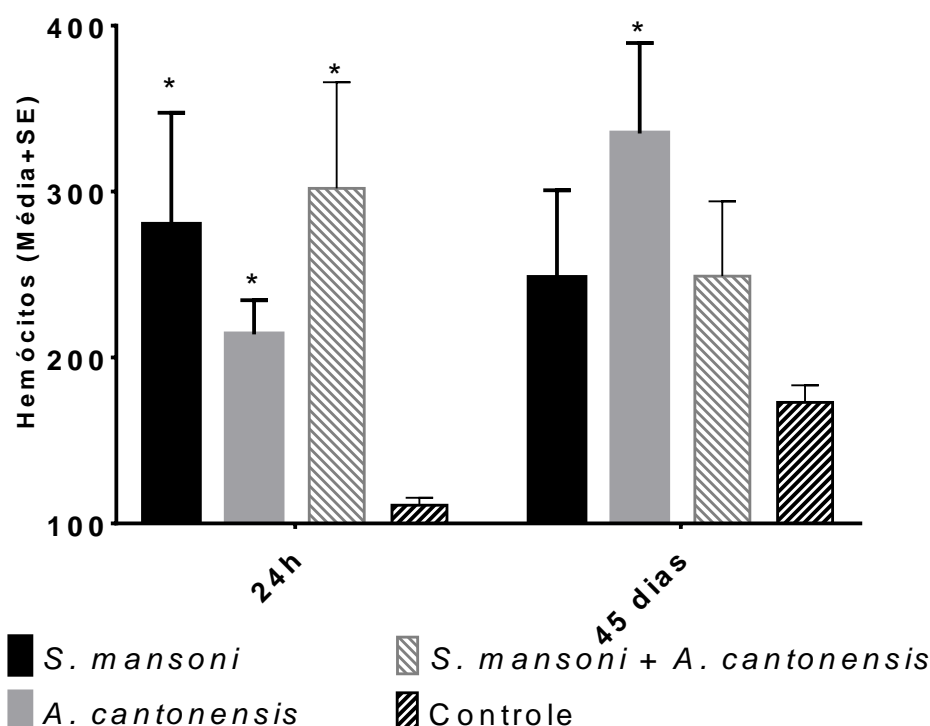
M de NaOH, e 33  $\mu$ L de glicogênio extraído foram homogeneizados em 33  $\mu$ L de fenol 5%. Em seguida adicionou-se 133  $\mu$ L de  $H_2SO_4$  98%, incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente e seguido de outra incubação (30°C por 20 min). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 490 nm, a concentração foi estimada contra uma curva padrão de glicogênio e os resultados expressos em  $\mu$ g de glicogênio /mg de tecido húmido (wt) (Lo et al., 1970).

### 3. Resultados

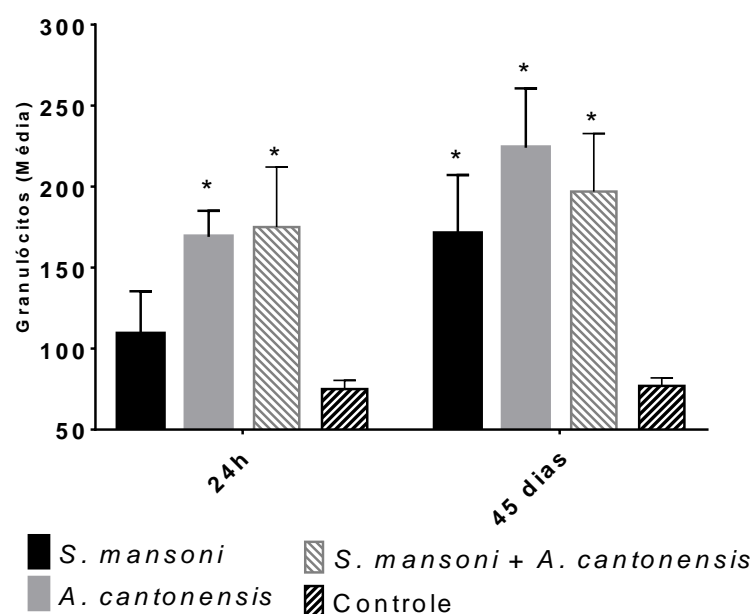
Para facilitar a comparação nos gráficos foram incluídos os resultados obtidos nos capítulos II e III referentes à infecção com apenas um parasita

#### 3.1. Contagem de hemócitos

O número de hemócitos circulantes na hemolinfa dos caramujos foi significativamente maior ( $p < 0.05$ ) após 24 h de infecção e o número de granulócitos foi significativamente maior após 24 h e 45 dias de infecção (Figuras 1 e 2).



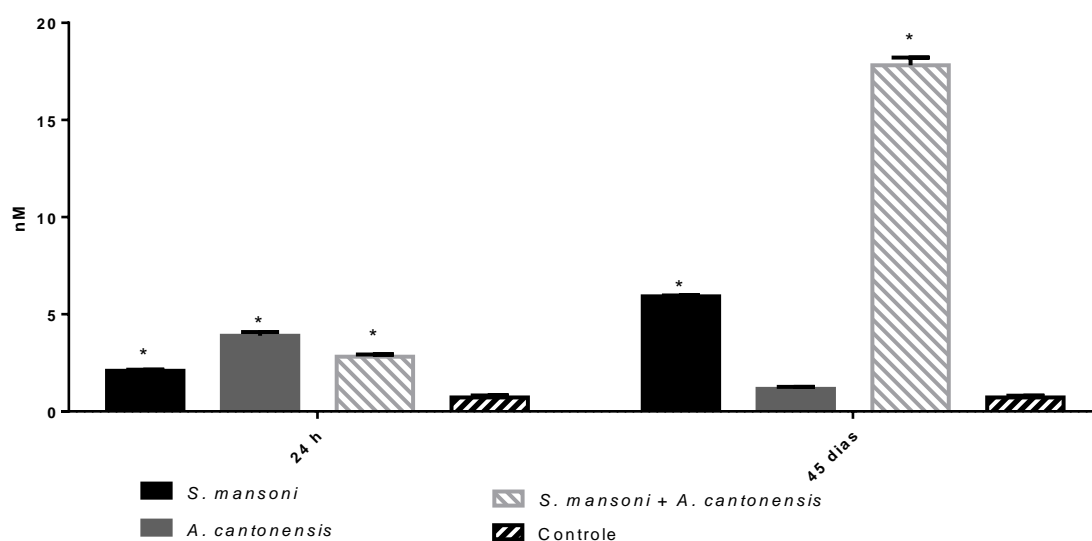
**Figura 1** – Contagem do número de hemócitos (média + erro padrão (SE))circulantes na hemolinfa de *B. glabrata* com 24 h ou 45 dias de infecção com *S. mansoni* e/ou *A. cantonensis* e respectivo controle não infectado (n=5). \*tem diferença significativa comparando com o grupo não infectado (One-way ANOVA,  $p < 0.05$ ).



**Figura 2** – Contagem do número (média e erro padrão) de granulócitos circulantes na hemolinfa de *B. glabrata* com 24 h ou 45 dias de infecção com *S. mansoni* e/ou *A. cantonensis* e respectivo controle não infectado. \*tem diferença significativa comparando com o grupo não infectado (*One-way ANOVA*,  $p < 0.05$ ).

### 3.2. Medida dos níveis de óxido nítrico na hemolinfa

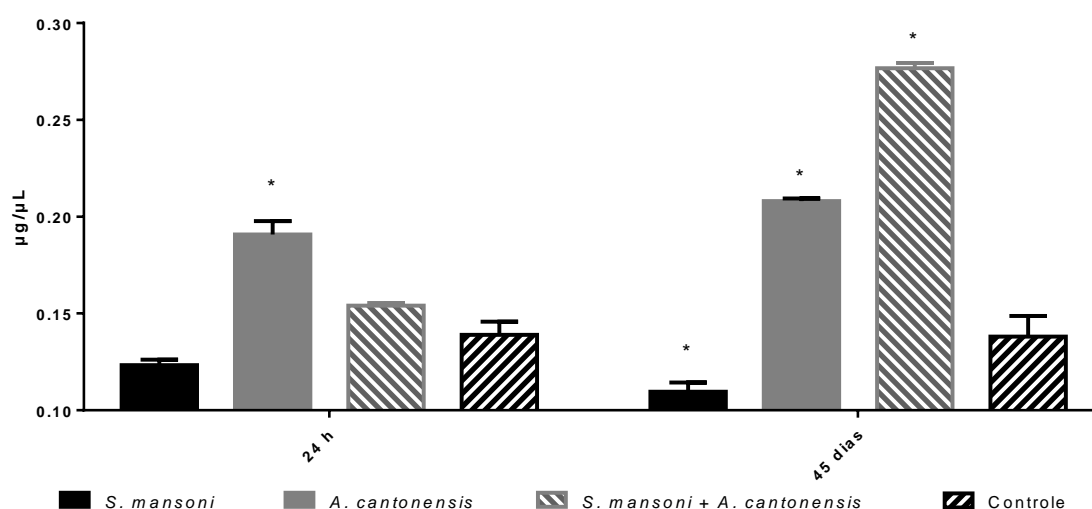
Comparado com o grupo controle, o nível de óxido nítrico na hemolinfa dos caramujos infectados, foi significativamente maior ( $p < 0.05$ ) tanto 24 h como 45 dias após a infecção (Figura 3).



**Figura 3** – Níveis (médias e erro padrão) de óxido nítrico (nM) na hemolinfa de *B. glabrata* com 24 h ou 45 dias de infecção com *S. mansoni* e/ou *A. cantonensis* e respectivo controle não infectado (n=5). \*Possuem diferenças significativas em relação ao grupo controle (*One-way* ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### 3.3. Determinação dos níveis de ácido úrico

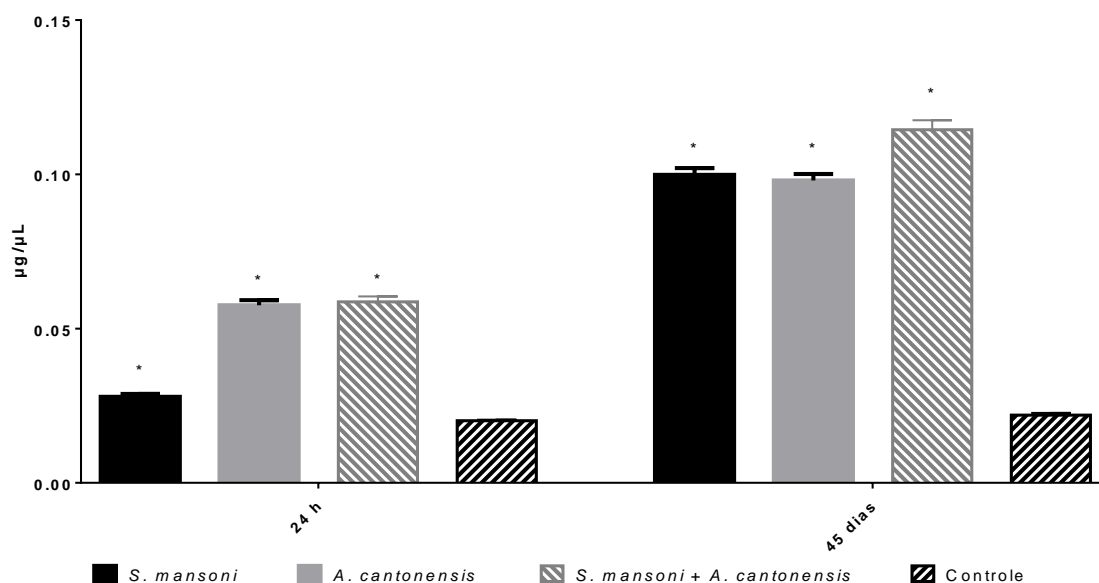
Os níveis de ácido úrico na hemolinfa dos caramujos foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) 45 dias de infecção não sendo encontrada diferença significativa após 24 h (Figura 4).



**Figura 4** – Níveis (média e erro padrão) de ácido úrico (µg/µL) na hemolinfa de *B. glabrata* com 24 h ou 45 dias de infecção com *S. mansoni* e/ou *A. cantonensis* e respectivo controle não infectado (n=5). \*Possuem diferenças significativas em relação ao grupo controle (*One-way* ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### 3.4. Concentração de uréia na hemolinfa

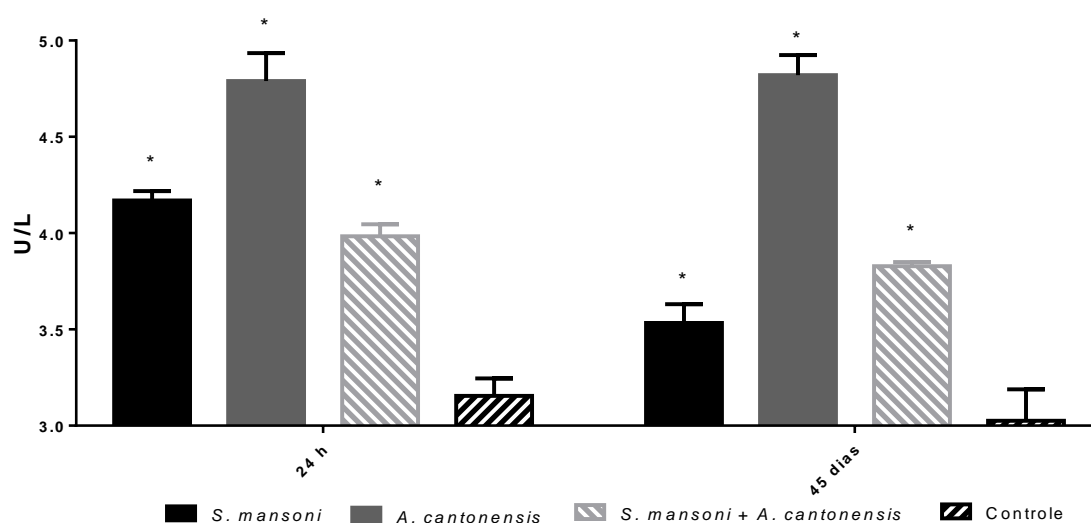
A concentração de uréia foi significativamente mais elevada em caramujos com 24 h e 45 dias de infecção ( $p < 0,05$ ) comparando com o grupo controle (Figura 5)



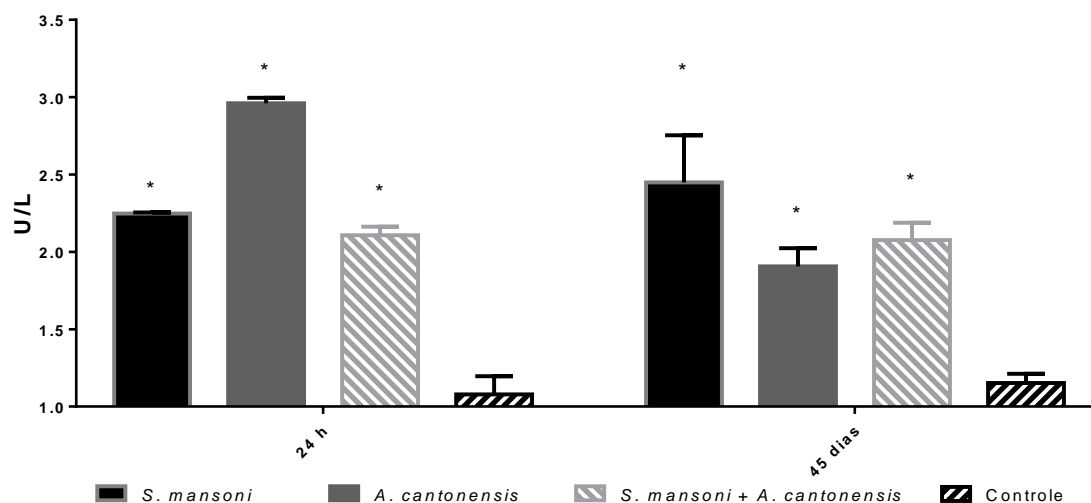
**Figura 5** – Níveis (média e erro padrão) de uréia ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) na hemolinfa de *B. glabrata* com 24 h ou 45 dias de infecção com *S. mansoni* e/ou *A. cantonensis* e respectivo controle não infectado ( $n=5$ ). \*Possuem diferenças significativas em relação ao grupo controle (*One-way* ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### 3.5. Determinação da atividade de aminotransferases

A atividade de aspartato (Figura 6) e alinina (Figura 7) aminotransferases apresentou um aumento significativo 24 h e 45 dias após a infecção ( $p < 0,05$ ).



**Figura 6** – Atividade de aspartato aminotransferase (AST) em *B. glabrata* com 24 h ou 45 dias de infecção com *S. mansoni* e/ou *A. cantonensis* e respectivo controle não infectado (n=5). \*Possuem diferenças significativas em relação ao grupo controle (*One-way* ANOVA,  $p<0,05$ ).

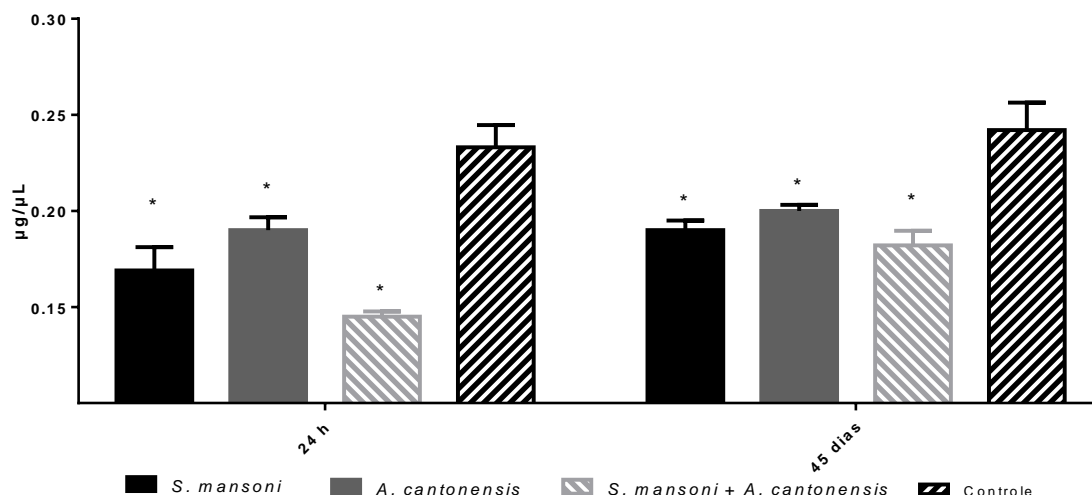


**Figura 7** – Atividade de alanina aminotransferase (ALT) em *B. glabrata* com 24 h ou 45 dias de infecção com *S. mansoni* e/ou *A. cantonensis* e respectivo controle não infectado. \*Possuem diferenças significativas em relação ao grupo controle (*One-way* ANOVA,  $p<0,05$ ).

### 3.6. Determinação dos níveis de cálcio na hemolinfa

A determinação dos níveis de cálcio na hemolinfa indicaram uma redução significativa deste íon na hemolinfa de caramujos infectados (24h e 45 dias).

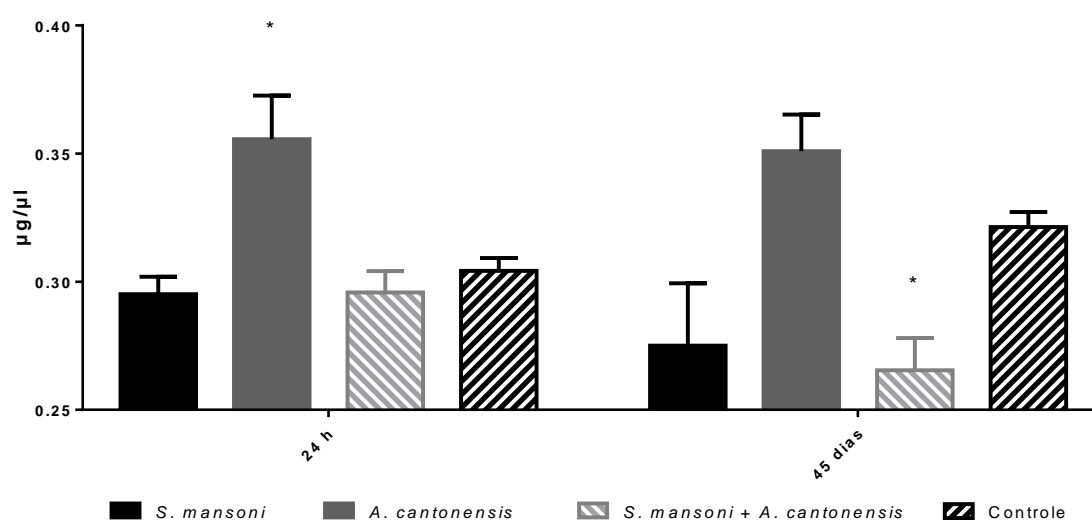




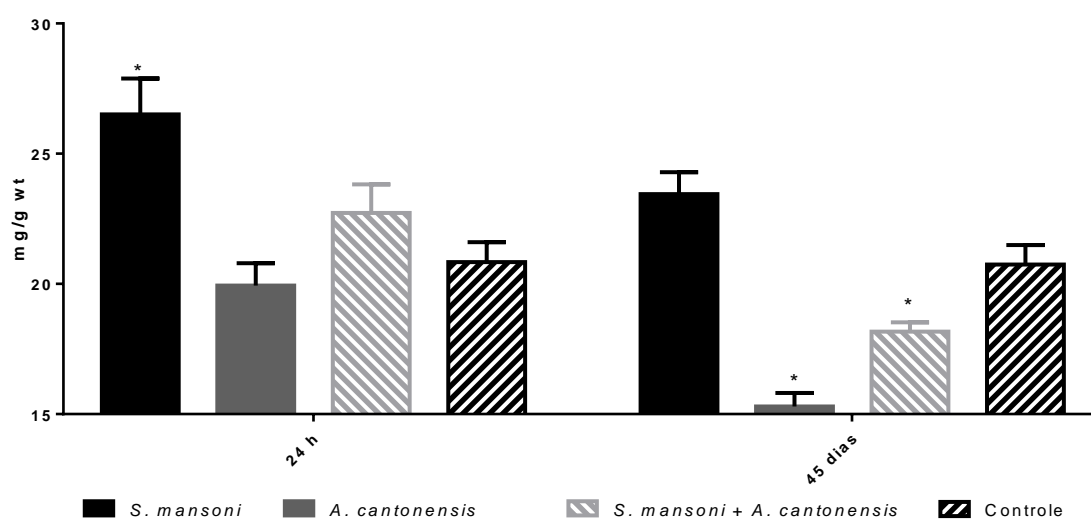
**Figura 8** – Níveis de cálcio ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) na hemolinfa de *B. glabrata* com 24 h ou 45 dias de infecção com *S. mansoni* e/ou *A. cantonensis* e respectivo controle não infectado ( $n=5$ ). \*Possuem diferenças significativas em relação ao grupo controle (One-way ANOVA,  $p<0,05$ ).

### 3.7. Concentração de glicogênio

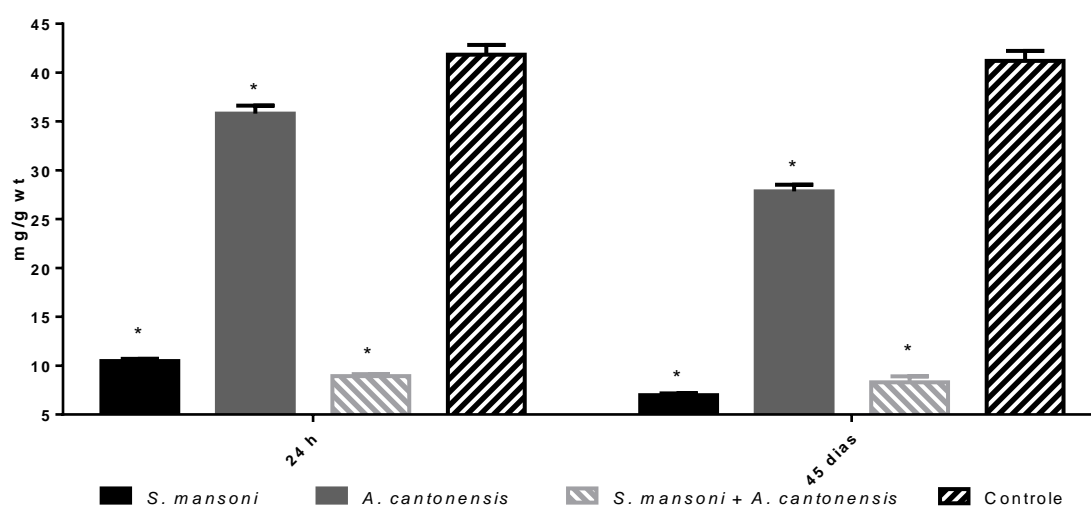
Foi observada uma redução significativa de glicogênio na hemolinfa (Figura 9) e na região cefalopodal (Figura 10) de *B. glabrata* após 45 dias de infecção. No complexo gonadal – glândula digestiva (Figura 11) esta diminuição foi significativa após 24 h de infecção e, aos 45 dias de infecção se manteve significativamente reduzida.



**Figura 9** – Níveis de glicogênio ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) na hemolinfa de *B. glabrata* com 24 h ou 45 dias de infecção com *S. mansoni* e/ou *A. cantonensis* e respectivo controle não infectado ( $n=5$ ). \*Possuem diferenças significativas em relação ao grupo controle (One-way ANOVA,  $p<0,05$ ).



**Figura 10** – Níveis de glicogênio (mg/g wt) na região cefalopodal de *B. glabrata* com 24 h ou 45 dias de infecção com *S. mansoni* e/ou *A. cantonensis* e respectivo controle não infectado. \*Possuem diferenças significativas em relação ao grupo controle (*One-way* ANOVA,  $p < 0,05$ ).



**Figura 11** – Níveis de glicogênio (µg/µL) no complexo gonadal-glândula digestiva com 24 h ou 45 dias de infecção com *S. mansoni* e/ou *A. cantonensis* e respectivo controle não infectado. \*Possuem diferenças significativas em relação ao grupo controle (*One-way* ANOVA,  $p < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

O aumento do número de hemócitos circulantes na hemolinfa dos caramujos coinfectados com *S. mansoni* e *A. cantonensis* 24 h após a infecção (figura 1), representa um estímulo do sistema imune de *B. glabrata* que aumenta o número de hemócitos, as principais

células efetoras do seu sistema imune, em resposta à infecção (Pereira et al., 2006). Embora este aumento não seja significativo aos 45 dias, é possível que tenha ocorrido migração dos hemócitos para os tecidos, em direção ao local de infecção, semelhante ao relatado anteriormente na infecção por *S. mansoni* (capítulo II). Além do mais, o número de granulócitos (com atividade fagocítica) foi significativamente maior em ambas as fases de infecção, reforçando que existe um estímulo do sistema imune celular do caramujo (Figura 2). Além disso os níveis de NO, produzido pelos hemócitos e crucial na resposta imune do caramujo, estavam significativamente aumentados 24 h e 45 dias pi (figura 3) (Adema et al., 2017; Pereira et al., 2006).

O íon cálcio também desempenha um papel crucial na resposta aos parasitas. Caramujos infectados apresentaram níveis reduzidos deste íon (figura 8), possivelmente pela sua deposição nos tecidos, em resposta a reações inflamatórias causadas pelos parasitas (Mostafa, 2007; Tunholi-Alves et al., 2014). A diminuição de cálcio também pode ser atribuída à maior necessidade energética do caramujo que obtém energia por reações oxidativas catalisadas por enzimas que utilizam o cálcio como cofator. Além da utilização pelo caramujo, é possível que o próprio parasita absorva cálcio direto do hospedeiro, utilizando-o para o seu desenvolvimento e metabolismo (Tunholi-Alves et al., 2014).

Durante situações de estresse como a infecção por parasitas ocorre um aumento do consumo energético, não só pelo consumo de glicogênio (figuras 9, 10 e 11) pelos patógenos, mas também devido ao consumo de energia na resposta imunitária. Este déficit energético leva a um consumo das reservas de glicose do caramujo, que são mobilizadas da região do complexo gonadal – glândula digestiva para a hemolinfa promovendo a homeostase de glucose (Faro et al., 2013). Além disso, o aumento da atividade das aminotransferases (figuras 6 e 7) aponta um aumento na gluconeogenese e ciclo de Krebs, uma vez que AST e ALT são enzimas que desempenham um papel importante nesta via (Pinheiro et al., 2001).

Durante a infecção acaba por ocorrer uma acumulação dos produtos de nitrogênio, não somente pela produção de NO pelos hemócitos, mas também como resultado do catabolismo de proteínas durante a gluconeogenese e ciclo de Krebs, sendo então necessário para o caramujo aumentar os níveis de uréia e ácido úrico (figuras 4 e 5) por aceleração da via da uréia para detoxificação destes produtos (Becker and Schmale, 1975; Souza et al., 2000; Tunholi-Alves et al., 2012).

## 5. Conclusão

Neste trabalho foi possível observar que a coinfecção de *S. mansoni* e *A. cantonensis* em *B. glabrata*, causa uma diminuição significativa das reservas glicogênicas do caramujo, possivelmente pelo consumo direto pelos parasitas e pelo aumento das necessidades energéticas do caramujo infectado. Este consumo energético leva a alterações metabólicas no molusco, como por exemplo o aumento da neoglucogênese, numa tentativa de compensar a perda de glicogênio. Compreender as alterações decorrentes durante a coinfecção pode ser uma ferramenta útil, permitindo não somente entender o que ocorre durante a coinfecção e a sua relevância na epidemiologia de ambas as parasitoses, mas também permite consolidar o nosso conhecimento sobre as alterações observadas durante infecção por apenas um parasita.

## 6. Referências

- Adema, C.M., Hillier, L.W., Jones, C.S., Loker, E.S., Knight, M., Minx, P., Oliveira, G., 2017. Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. 8, 15451.
- Becker, W., Schmale, H., 1975. The nitrogenous products of degradation—Ammonia, urea and uric acid—In the hemolymph of the snail *Biomphalaria glabrata*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 51, 407-411.
- Chilcote, M.E., Wasson, R.D., 1958. A new micro method for the colorimetric determination of calcium in serum or urine. Clinical chemistry 4, 200-210.
- Coustau, C., Gourbal, B., Duval, D., Yoshino, T.P., Adema, C.M., Mita, G., 2015. Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade. Fish & Shellfish Immunology 46, 5-16.
- Faro, M.J., Perazzini, M., Correa Ldos, R., Mello-Silva, C.C., Pinheiro, J., Mota, E.M., de Souza, S., de Andrade, Z., Junior, A.M., 2013. Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. Experimental parasitology 134, 228-234.
- Giannelli, A., Cantacessi, C., Colella, V., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2016. Gastropod-Borne Helminths: A Look at the Snail-Parasite Interplay. Trends in parasitology 32, 255-264.

- Guerino, L.R., Linhares, A.X., Magalhaes, L.A., Zanotti-Magalhaes, E.M., 2009. Attraction of *Schistosoma mansoni* miracidia to *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) in the presence of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes, 1971 infection. Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia 69, 1101-1105.
- Lo, S., Russell, J.C., Taylor, A.W., 1970. Determination of glycogen in small tissue samples. Journal of applied physiology 28, 234-236.
- Martins-Souza, R.L., Pereira, C.A.J., Coelho, P.M.Z., Negrão-Corrêa, D., 2003. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. Parasitology research 91, 500-507.
- Mostafa, O.M., 2007. Effects of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infections on calcium content in their intermediate hosts. Parasitology research 101, 963-966.
- Olivier, L., Stirewalt, M.A., 1952. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. The Journal of parasitology 38, 19-23.
- Pereira, C.A., Martins-Souza, R.L., Coelho, P.M., Lima, W.S., Negrão-Correa, D., 2006. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* susceptibility to *Schistosoma mansoni*. Acta tropica 98, 224-233.
- Pinheiro, J., Gomes, E.M., Chagas, G.M., 2001. Aminotransferases activity in the hemolymph of *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthonychidae) under starvation. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 96, 1161-1164.
- Sanders, G.T.B., Pasman, A.J., Hoek, F.J., 1980. Determination of uric acid with uricase and peroxidase. Clinica Chimica Acta 101, 299-303.
- Scholte, R.G., Carvalho, O.S., Malone, J.B., Utzinger, J., Vounatsou, P., 2012. Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. Geospatial health 6, S95-s101.
- Searcy, R.L., Reardon, J.E., Foreman, J.A., 1967. A new photometric method for serum urea nitrogen determination. The American journal of medical technology 33, 15-20.
- Souza, R.M.d., Gomes, E.M., Chagas, G.M., Pinheiro, J., 2000. The influence of starvation and *Eurytrema coelomaticum* infection on the nitrogenous products of degradation in the hemolymph of *Bradybaena similaris*. Brazilian Archives of Biology and Technology 43, 0-0.

Thiengo, S.C., Simoes Rde, O., Fernandez, M.A., Maldonado, A., Jr., 2013. *Angiostrongylus cantonensis* and rat lungworm disease in Brazil. *Hawai'i journal of medicine & public health : a journal of Asia Pacific Medicine & Public Health* 72, 18-22.

Tunholi-Alves, V.M., Tunholi, V.M., Garcia, J.S., Costa-Neto, S.F., Maldonado, A.J., Santos, M.A.J., Thiengo, S.C., Pinheiro, J., 2014. Changes in the calcium metabolism of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Journal of helminthology* 88, 160-165.

Tunholi-Alves, V.M., Tunholi, V.M., Pinheiro, J., Thiengo, S.C., 2012. Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata*. *Experimental parasitology* 131, 143-147.

## Discussão e Conclusões Gerais

Claramente durante a infecção pelos parasitas ocorre uma diminuição dos níveis de glicogênio, em particular das reservas presentes no complexo gonadal – glândula digestiva. Esta diminuição pode ser atribuída não somente ao consumo pelos parasitas, mas também ao aumento das necessidades energéticas do caramujo, que requer mais energia para ativar os mecanismos da resposta imune. Como resposta à depleção das reservas de glicogênio, outras vias metabólicas como a gluconeogênese e o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) são aumentadas, numa tentativa do caramujo compensar o déficit energético e manter a homeostase da glucose.

Durante a infecção por ambos parasitas observamos diversas alterações protéicas. Embora algumas alterações fossem comuns, foi possível observar diversas diferenças nas alterações proteômicas entre as infecções por *S. mansoni* e *A. cantonesnis*.

*S. mansoni* teve uma evolução muito restrita com o seu hospedeiro intermediário. Esta evolução foi tão paralela que parasitas de diferentes regiões geográficas têm dificuldade em infectar caramujos de diferentes localidades (DeJong et al., 2001). Existem diversas possibilidades de como ocorre esta especificidade, acreditando-se que esteja relacionada com diversos fatores imunes do molusco, no entanto ainda não há nenhuma teoria que nos dê uma resposta conclusiva. Isto se deve, em parte, à falta de entendimento de como diversas proteínas atuam na resposta imune. Para contornar este problema, tentou-se estabelecer um paralelo com outros organismos quando desafiados por patógenos. Entre as proteínas com expressão aumentada após a infecção, identificamos proteínas que desempenham algum papel imune em outros organismos. Compreender o seu papel é um passo importante no entendimento da imunologia de moluscos. Tão ou mais interessante que as proteínas de potencial imune com expressão aumentada, foi a presença de proteínas imunes com expressão diminuída. Entre estas, está a biomphalisina, uma proteína cuja atividade citolítica no esporocisto de *S. mansoni* já foi comprovada (Galinier et al., 2013). A expressão diminuída destas proteínas levanta uma importante questão, se a compatibilidade de *S. mansoni* e *B. glabrata* está relacionada à capacidade do parasita diminuir/inibir determinadas proteínas do sistema imune do caramujo. Já foi demonstrado que *S. mansoni* consegue modular a expressão de HSP-70 em caramujos sensíveis através do reposicionamento espacial de genes ativados, sendo incapaz de fazê-lo em caramujos resistentes (Arican-Goktas et al., 2014), assim sendo não seria improvável que a compatibilidade parasita/molusco estivesse

dependente da capacidade do parasita modular a resposta imune de *B. glabrata*, diminuindo a expressão de determinadas proteínas como a biomphalisina.

Contrariamente a *S. mansoni*, *A. cantonensis* tem uma relação mais promiscua com o seu hospedeiro intermediário sendo eurixeno em relação ao seu vetor, o parasita evoluiu no sentido de conseguir infectar e se desenvolver em uma grande diversidade de moluscos, além de se manter vivo em uma grande diversidade de hospedeiros paratênicos (Espírito-Santo et al., 2013; Oehler et al., 2014). Considerando os diferentes ciclos de vida dos dois parasitas, esta tendência evolutiva pode ser justificada. Todas as fases do ciclo de *S. mansoni* que ocorrem fora dos hospedeiros, ocorrem dentro de água, onde após a eclosão, o miracídio nada ativamente em busca do molusco (Reimert et al., 2008; Thetiot-Laurent et al., 2013). No caso de *A. cantonensis*, o ciclo ocorre principalmente no meio terrestre e, mesmo ocorrendo no meio aquático, a larva não procura ativamente um hospedeiro, mas está dependente de ser encontrada, assim sendo terá sido mais vantajoso para o parasita poder se adaptar a viver em uma maior diversidade de hospedeiros (Sauerlander, 1976). Estas diferenças implicam também em diferenças na interação parasita hospedeiro invertebrado. Em *B. glabrata* infectada com *A. cantonensis* observaram-se menos proteínas de potencial papel imune com expressão alterada. A maioria das proteínas diferencialmente expressas, aparentemente parecem estar mais relacionadas a déficit energético, dano na musculatura do caramujo ou com regulação de derivados de nitrito (como NO). Assim sendo, é possível que, ao invés de “lutar” contra o sistema imunitário ou de alterar diretamente a expressão protéica, o parasita se esquive do sistema imune por métodos diretos ou indiretos.

Uma proteína interessante encontrada com expressão aumentada na infecção por *A. cantonensis* foi a temptina, esta proteína tem sido associada com aumento do estímulo de reprodução do caramujo, sendo uma proteína presente numa grande diversidade de moluscos terrestres e aquáticos (Pila et al., 2017). É possível que este estímulo seja benéfico para o parasita, pois estimulando a reprodução do molusco, parte dos recursos energéticos do caramujo serão desviados da resposta imune. Outro ponto importante relacionado com a proteína temptina é a possibilidade que esta seja um dos atrativos que o miracídio de *S. mansoni* utiliza para localizar o molusco (Pila et al., 2017). Embora ainda não se tenha obtido confirmação conclusiva do papel desta proteína na atração do miracídio, Guerino et al. (2009) mostraram que caramujos *B. glabrata* previamente infectados com *Angyostrongylus costarisensis* são mais atrativos para os miracídios. Além disso, embora haja uma aparente competição por nutrientes, ambos parasitas são capazes de sobreviver dentro do mesmo



hospedeiro. Assim sendo a infecção por *A. cantonensis* em *Biomphalaria*, deixa de ser um problema exclusivamente relacionado com a disseminação deste parasita, mas também um problema relacionado com a esquistossomose, uma vez que caramujos previamente infectados com o nematódeo seriam mais facilmente encontrados pelo miracídio aumentando o número de moluscos infectados e, consequentemente a probabilidade de infecção humana.

Em ambas as situações de infecção pelos parasitas, foi encontrado um aumento na expressão da proteína não caracterizada LOC106059779. Esta proteína tem um domínio Peptidase M12B, ADAM/reprolisina, sendo uma metaloproteinase de matriz atuando na morfogênese/remodelação de tecidos, inflamação e associada com atividade ligante larval. Tem sido sugerido que o aumento desta proteína é vantajoso para a mobilização do parasita pelos tecidos, pois ocorre uma maior degradação da matriz protéica endógena do hospedeiro (Wu et al., 2017). O aumento desta proteína em *B. glabrata* infectada por ambos os parasitas levanta questões, quão importante é este aumento para o sucesso de infecção, se o aumento é provocado diretamente pelos parasitas ou é consequência de outros fatores associados à infecção e se provocado pelos parasitas, os mecanismos associados são os mesmos? Responder a estas questões pode trazer novas formas de combate da infecção destas parasitoses podendo até funcionar contra outras parasitoses que utilizem o mesmo mecanismo durante a infecção de caramujos.

*B. glabrata* possui uma resposta variada e sistema imune complexo, sendo difícil de interpretar. A publicação recente do genoma de *B. glabrata* (Adema et al., 2017) tem auxiliado na descoberta de quais as proteínas presentes no molusco a partir de modelo preditivos. Contudo, a grande falta de informação e de ferramentas de análise que indiquem a função específica de proteínas no contexto decorrente da infecção, dificultam a interpretação de resultados. Apesar destas limitações, neste trabalho tentou-se elucidar algumas das alterações em *B. glabrata* durante a infecção por *S. mansoni* e *A. cantonensis*. Foram observados pontos semelhantes, mas também observamos diferenças entre respostas, provavelmente devido às diferenças de estratégia e evolução entre os parasitas. Será também importante entender a interação entre os dois parasitas em *Biomphalaria*, pois é possível que a presença de um influencie o sucesso do outro, aumentando o risco para as populações humanas. Embora tenham sido levantadas algumas hipóteses de como as proteínas diferencialmente expressas interferem no sucesso de infecção, ainda muitos estudos serão necessários antes de se comprovar como todas as alterações no caramujo influenciam o sucesso do parasita.

## Referências Gerais

- Adema, C.M., Hanington, P.C., Lun, C.-M., Rosenberg, G.H., Aragon, A.D., Stout, B.A., Lennard Richard, M.L., Gross, P.S., Loker, E.S., 2010. Differential transcriptomic responses of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Mollusca) to bacteria and metazoan parasites, *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraense* (Digenea, Platyhelminthes). *Molecular Immunology* 47, 849-860.
- Adema, C.M., Hillier, L.W., Jones, C.S., Loker, E.S., Knight, M., Minx, P., Oliveira, G., 2017. Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. 8, 15451.
- Alberto-Silva, A.C., Santos, E.G.N., Santos, C.P., Mello-Silva, C.C., 2015. Changes in the locomotory and reproductive behavior of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *Experimental parasitology* 153, 68-74.
- Allan, E.R., Tennessen, J.A., Bollmann, S.R., Hanington, P.C., Bayne, C.J., Blouin, M.S., 2017. Schistosome infectivity in the snail, *Biomphalaria glabrata*, is partially dependent on the expression of Grctm6, a Guadeloupe Resistance Complex protein. *PLoS neglected tropical diseases* 11, e0005362.
- Alvira, C.M., Umesh, A., Husted, C., Ying, L., Hou, Y., Lyu, S.-C., Nowak, J., Cornfield, D.N., 2012. Voltage-dependent anion channel-2 interaction with nitric oxide synthase enhances pulmonary artery endothelial cell nitric oxide production. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 47, 669-678.
- Arican-Goktas, H.D., Ittiprasert, W., Bridger, J.M., Knight, M., 2014. Differential spatial repositioning of activated genes in *Biomphalaria glabrata* snails infected with *Schistosoma mansoni*. *PLoS neglected tropical diseases* 8, e3013.
- Barcante, J.M., Barcante, T.A., Dias, S.R., Vieira, L.Q., Lima, W.S., Negrao-Correa, D., 2003. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. *Parasitology research* 89, 89-93.
- Bayne, C.J., 2009. Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: a 2009 assessment. *Molecular and biochemical parasitology* 165, 8-18.
- Bayne, C.J., Hahn, U.K., Bender, R.C., 2001. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. *Parasitology* 123 Suppl, S159-167.
- Becker, W., Schmale, H., 1975. The nitrogenous products of degradation—Ammonia, urea and uric acid—In the hemolymph of the snail *Biomphalaria glabrata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 51, 407-411.
- Behera, B.C., Sethi, B.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K., Thatoi, H.N., 2017. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 15, 197-210.
- Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L., 2002. *Biochemistry*, 5 Edition. W. H. Freeman and Company, New York.

Botros, S.S., Bennett, J.L., 2007. Praziquantel resistance. Expert opinion on drug discovery 2, S35-40.

Bouchut, A., Coustau, C., Gourbal, B., Mita, G., 2007. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: new candidate genes evidenced by a suppressive subtractive hybridization approach. Parasitology 134, 575-588.

Bouchut, A., Sautiere, P.E., Coustau, C., Mita, G., 2006. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: Potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach. Acta tropica 98, 234-246.

Campos, Y.R., Carvalho, O.S., Goveia, C.O., Romanha, A.J., 2002. Genetic variability of the main intermediate host of the *Schistosoma mansoni* in Brazil, *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) assessed by SSR-PCR. Acta tropica 83, 19-27.

Chilcote, M.E., Wasson, R.D., 1958. A new micro method for the colorimetric determination of calcium in serum or urine. Clinical chemistry 4, 200-210.

Coelho, P., Andrade, Z.A., Borges, C., Ribeiro, F., Barbosa, L., 2008. Evolução de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro intermediário, In: Mendes, J., Lima, N., Santos, R. (Eds.) *Schistosoma mansoni* Esquistossomose uma visão multidisciplinar. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 147-160.

Correa, S.A.P., de Oliveira, R.N., Mendes, T.M.F., Dos Santos, K.R., Boaventura, S., Jr., Garcia, V.L., Jeraldo, V.L.S., Allegretti, S.M., 2019. *In vitro* and *in vivo* evaluation of six artemisinin derivatives against *Schistosoma mansoni*. Parasitology research.

Coustau, C., Gourbal, B., Duval, D., Yoshino, T.P., Adema, C.M., Mita, G., 2015. Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade. Fish & Shellfish Immunology 46, 5-16.

Cox, J., Mann, M., 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nature biotechnology 26, 1367-1372.

DeJong, R.J., Morgan, J.A., Paraense, W.L., Pointier, J.P., Amarista, M., Ayeh-Kumi, P.F., Babiker, A., Barbosa, C.S., Bremond, P., Pedro Canese, A., de Souza, C.P., Dominguez, C., File, S., Gutierrez, A., Incani, R.N., Kawano, T., Kazibwe, F., Kpikpi, J., Lwambo, N.J., Mimpfoundi, R., Njiokou, F., Noel Poda, J., Sene, M., Velasquez, L.E., Yong, M., Adema, C.M., Hofkin, B.V., Mkoji, G.M., Loker, E.S., 2001. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. Molecular biology and evolution 18, 2225-2239.

Esch, G.W., Barger, M.A., Fellis, K.J., 2002. The Transmission of Digenetic Trematodes: Style, Elegance, Complexity1. Integrative and Comparative Biology 42, 304-312.

Espirito-Santo, M.C., Pinto, P.L., Mota, D.J., Gryschek, R.C., 2013. The first case of *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis diagnosed in the city of Sao Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 55, 129-132.

Fallon, P.G., Doenhoff, M.J., 1994. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. The American journal of tropical medicine and hygiene 51, 83-88.

Faro, M.J., Perazzini, M., Correa Ldos, R., Mello-Silva, C.C., Pinheiro, J., Mota, E.M., de Souza, S., de Andrade, Z., Junior, A.M., 2013. Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. Experimental parasitology 134, 228-234.

Galinier, R., Portela, J., Mone, Y., Allienne, J.F., Henri, H., Delbecq, S., Mitta, G., Gourbal, B., Duval, D., 2013. Biomphalysin, a new beta pore-forming toxin involved in *Biomphalaria glabrata* immune defense against *Schistosoma mansoni*. PLoS Pathog 9, e1003216.

Galinier, R., Roger, E., Mone, Y., Duval, D., Portet, A., 2017. A multistrain approach to studying the mechanisms underlying compatibility in the interaction between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. 11, e0005398.

Giannelli, A., Cantacessi, C., Colella, V., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2016. Gastropod-Borne Helminths: A Look at the Snail-Parasite Interplay. Trends in parasitology 32, 255-264.

Giovanelli, A., Vieira, M.V., Silva, C.L.P.A.C.d., 2002. Interaction between the Intermediate Host of Schistosomiasis in Brazil *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae) and a Possible Competitor *Melanoides tuberculata* (Thiaridae): I. Laboratory Experiments. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 97, 363-369.

Graeff-Teixeira, C., Morassutti, A.L., Jones, M.K., 2018. Diagnosing and Understanding Angiostrongyliasis, A Zoonotic Cause of Meningitis. ACS Chemical Neuroscience 9, 393-394.

Guerino, L.R., Linhares, A.X., Magalhaes, L.A., Zanotti-Magalhaes, E.M., 2009. Attraction of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 miracidia to *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) in the presence of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes, 1971 infection. Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia 69, 1101-1105.

Hagen, J., Scheerlinck, J.-P.Y., Gasser, R.B., 2015. Knocking down schistosomes – promise for lentiviral transduction in parasites. Trends in parasitology 31, 324-332.

Hara, M.R., Agrawal, N., Kim, S.F., Cascio, M.B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J.H., Tankou, S.K., Hester, L.D., Ferris, C.D., Hayward, S.D., Snyder, S.H., Sawa, A., 2005. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. Nature cell biology 7, 665-674.

Henty-Ridilla, J.L., Shimono, M., Li, J., Chang, J.H., Day, B., Staiger, C.J., 2013. The plant actin cytoskeleton responds to signals from microbe-associated molecular patterns. PLoS pathogens 9, e1003290-e1003290.

Lefebvre, C., Vandenbulcke, F., Bocquet, B., Tasiemski, A., Desmons, A., Verstraete, M., Salzet, M., Cocquerelle, C., 2008. Cathepsin L and cystatin B gene expression discriminates immune coelomic cells in the leech *Theromyzon tessulatum*. Developmental and comparative immunology 32, 795-807.

- Lemos, Q.T., 1999. Contribution to the histology of *Biomphalaria glabrata*. Rev Soc Bras Med Trop 32, 343-347.
- Lo, S., Russell, J.C., Taylor, A.W., 1970. Determination of glycogen in small tissue samples. Journal of applied physiology 28, 234-236.
- Loker, E.S., Adema, C.M., Zhang, S.M., Kepler, T.B., 2004. Invertebrate immune systems--not homogeneous, not simple, not well understood. Immunological reviews 198, 10-24.
- Ly, S., Zhang, Y., Liu, H.X., Zhang, C.W., Steinmann, P., Zhou, X.N., Utzinger, J., 2009. *Angiostrongylus cantonensis*: morphological and behavioral investigation within the freshwater snail *Pomacea canaliculata*. Parasitology research 104, 1351-1359.
- Maldonado, J.F., Acosta Matienzo, J., 1947. The development of *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Australorbis glabratus*. The Puerto Rico journal of public health and tropical medicine 22, 331-373, Spanish transl, 374-404.
- Martins-Souza, R.L., Pereira, C.A.J., Coelho, P.M.Z., Negrão-Corrêa, D., 2003. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. Parasitology research 91, 500-507.
- Massara, C.L., Schall, V.T., 2004. A Pedagogical approach of schistosomiasis -- an experience in health education in Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 99, 113-119.
- Mele, L., Paino, F., Papaccio, F., Regad, T., Boocock, D., Stiuso, P., Lombardi, A., Liccardo, D., Aquino, G., Barbieri, A., Arra, C., Coveney, C., La Noce, M., Papaccio, G., Caraglia, M., Tirino, V., Desiderio, V., 2018. A new inhibitor of glucose-6-phosphate dehydrogenase blocks pentose phosphate pathway and suppresses malignant proliferation and metastasis in vivo. Cell death & disease 9, 572-572.
- Mello-Silva, C.C., Vilar, M.M., Bezerra, J., Vasconcellos, M.C., Jairo, P., Rodrigues, M., 2007. Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata* exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopianii* latex. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 102, 671-674.
- Mello-Silva, C.C., Vilar, M.M., Vasconcellos, M.C., Pinheiro, J., Rodrigues Mde, L., 2010. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopianii* latex. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 105, 492-495.
- Mitta, G., Gourbal, B., Grunau, C., Knight, M., Bridger, J.M., Theron, A., 2017. The Compatibility Between *Biomphalaria glabrata* Snails and *Schistosoma mansoni*: An Increasingly Complex Puzzle. Advances in parasitology 97, 111-145.
- Mone, Y., Ribou, A.C., Cosseau, C., Duval, D., Theron, A., Mitta, G., Gourbal, B., 2011. An example of molecular co-evolution: reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni*/*Biomphalaria glabrata* interactions. Int J Parasitol 41, 721-730.
- Morassutti, A.L., Perelygin, A., MO, D.E.C., Lemos, L.N., Pinto, P.M., Frace, M., Wilkins, P.P., Graeff-Teixeira, C., AJ, D.A.S., 2013. High throughput sequencing of the

*Angiostrongylus cantonensis* genome: a parasite spreading worldwide. *Parasitology* 140, 1304-1309.

Morassutti, A.L., Thiengo, S.C., Fernandez, M., Sawanyawisuth, K., Graeff-Teixeira, C., 2014. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 109, 399-407.

Mostafa, O.M., 2007. Effects of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infections on calcium content in their intermediate hosts. *Parasitology research* 101, 963-966.

Murphy, G.S., Johnson, S., 2013. Clinical aspects of eosinophilic meningitis and meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*, the rat lungworm. *Hawai'i journal of medicine & public health : a journal of Asia Pacific Medicine & Public Health* 72, 35-40.

Musante, L., Candiano, G., Bruschi, M., Santucci, L., Marco Ghiggeri, G., 2007. 67 - ANTI-ATP SYNTHASE  $\beta$ -CHAIN AUTOANTIBODIES, In: Shoenfeld, Y., Gershwin, M.E., Meroni, P.L. (Eds.) *Autoantibodies* (Second Edition). Elsevier, Burlington, pp. 547-552.

Myers, J., Ittiprasert, W., Raghavan, N., Miller, A., Knight, M., 2008. Differences in cysteine protease activity in *Schistosoma mansoni*-resistant and -susceptible *Biomphalaria glabrata* and characterization of the hepatopancreas cathepsin B Full-length cDNA. *The Journal of parasitology* 94, 659-668.

Nelson, B.R., Makarewich, C.A., Anderson, D.M., Winders, B.R., Troupes, C.D., Wu, F., Reese, A.L., McAnally, J.R., Chen, X., Kavalali, E.T., Cannon, S.C., Houser, S.R., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2016. A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science (New York, N.Y.)* 351, 271-275.

Oehler, E., Ghawche, F., Delattre, A., Berberian, A., Levy, M., Valour, F., 2014. *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis: A clinical study of 42 consecutive cases in French Polynesia. *Parasitology international* 63, 544-549.

Olivier, L., Stirewalt, M.A., 1952. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of parasitology* 38, 19-23.

Ottaviani, E., 1992. Immunorecognition in the gastropod molluscs with particular reference to the freshwater snail *Planorbis corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata). *Bollettino di zoologia* 59, 129-139.

Paraense, W.L., 2001. The schistosome vectors in the Americas. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 96 Suppl, 7-16.

Pereira, C.A., Martins-Souza, R.L., Coelho, P.M., Lima, W.S., Negrao-Correa, D., 2006. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* susceptibility to *Schistosoma mansoni*. *Acta tropica* 98, 224-233.

Pila, E.A., Gordy, M.A., Phillips, V.K., Kabore, A.L., Rudko, S.P., Hanington, P.C., 2016. Endogenous growth factor stimulation of hemocyte proliferation induces resistance to *Schistosoma mansoni* challenge in the snail host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, 5305-5310.

- Pila, E.A., Peck, S.J., Hanington, P.C., 2017. The protein pheromone temptin is an attractant of the gastropod *Biomphalaria glabrata*. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* 203, 855-866.
- Pinheiro, J., Gomes, E.M., Chagas, G.M., 2001. Aminotransferases activity in the hemolymph of *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthonychidae) under starvation. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 96, 1161-1164.
- Pivovarov, A.S., Murzina, G.B., Makhnovskii, D.A., Vasil'eva, N.A., Tret'yakova, M.S., 2014. The Role of Myosins in Depression of Neuron Sensitivity to Acetylcholine in a Cellular Analog of Habituation in the Common Snail. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 44, 1039-1045.
- Plesch, B., 1977. An ultrastructural study of the musculature of the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Cell and tissue research* 180, 317-340.
- Prasidthrathsint, K., Lewis, J., Couturier, M.R., 2017. The Brief Case: *Angiostrongylus cantonensis* Eosinophilic Meningitis in a Returned Traveler. *Journal of clinical microbiology* 55, 2880-2883.
- Raso, G., N'Goran, E.K., Toty, A., Luginbuhl, A., Adjoua, C.A., Tian-Bi, N.T., Bogoch, II, Vounatsou, P., Tanner, M., Utzinger, J., 2004. Efficacy and side effects of praziquantel against *Schistosoma mansoni* in a community of western Cote d'Ivoire. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98, 18-27.
- Reimert, C.M., Tukahebwa, E.M., Kabatereine, N.B., Dunne, D.W., Vennervald, B.J., 2008. Assessment of *Schistosoma mansoni* induced intestinal inflammation by means of eosinophil cationic protein, eosinophil protein X and myeloperoxidase before and after treatment with praziquantel. *Acta tropica* 105, 253-259.
- Richards, C.S., Merritt, J.W., 1967. Studies on *Angiostrongylus cantonensis* in Molluscan Intermediate Hosts. *The Journal of parasitology* 53, 382-388.
- Roger, E., Grunau, C., Pierce, R.J., Hirai, H., Gourbal, B., Galinier, R., Emans, R., Cesari, I.M., Cosseau, C., Mitta, G., 2008. Controlled chaos of polymorphic mucins in a metazoan parasite (*Schistosoma mansoni*) interacting with its invertebrate host (*Biomphalaria glabrata*). *PLoS neglected tropical diseases* 2, e330.
- Sanders, G.T.B., Pasman, A.J., Hoek, F.J., 1980. Determination of uric acid with uricase and peroxidase. *Clinica Chimica Acta* 101, 299-303.
- Sandiford, S.L., Dong, Y., Pike, A., Blumberg, B.J., Bahia, A.C., Dimopoulos, G., 2015. Cytoplasmic Actin Is an Extracellular Insect Immune Factor which Is Secreted upon Immune Challenge and Mediates Phagocytosis and Direct Killing of Bacteria, and Is a *Plasmodium* Antagonist. *PLOS Pathogens* 11, e1004631.
- Sauerlander, R., 1976. [Histological studies of the African giant snail (*Achatina fulica*) experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* or *Angiostrongylus cantonensis* (author's transl)]. *Zeitschrift fur Parasitenkunde (Berlin, Germany)* 49, 263-280.

Scholte, R.G., Carvalho, O.S., Malone, J.B., Utzinger, J., Vounatsou, P., 2012. Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. *Geospatial health* 6, S95-s101.

Searcy, R.L., Reardon, J.E., Foreman, J.A., 1967. A new photometric method for serum urea nitrogen determination. *The American journal of medical technology* 33, 15-20.

Sharma, K., Antunes, I.L., Rajulapati, V., Goyal, A., 2018. Low-resolution SAXS and comparative modeling based structure analysis of endo-beta-1,4-xylanase a family 10 glycoside hydrolase from *Pseudopedobacter saltans* comb. nov. *International journal of biological macromolecules* 112, 1104-1114.

Silva, L.D., Amaral, V.C.S., Vinaud, M.C., Castro, A.M., Rezende, H.H.A., Santos, D.B., Mello-Silva, C.C., Bezerra, J.C.B., 2017. Changes in energetic metabolism of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae) in response to exogenous calcium. *Brazilian Journal of Biology* 77, 304-311.

Souza, R.M.d., Gomes, E.M., Chagas, G.M., Pinheiro, J., 2000. The influence of starvation and *Eurytrema coelomaticum* infection on the nitrogenous products of degradation in the hemolymph of *Bradybaena similaris*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 43, 0-0.

Spiegel, A.M., 1987. Signal transduction by guanine nucleotide binding proteins. *Molecular and cellular endocrinology* 49, 1-16.

Stewart, G.L., Ubelaker, J.E., Curtis, D., 1985. Pathophysiologic alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Angiostrongylus costaricensis*. *Journal of invertebrate pathology* 45, 152-157.

Subedi, K.P., Kim, J.C., Kang, M., Son, M.J., Kim, Y.S., Woo, S.H., 2011. Voltage-dependent anion channel 2 modulates resting Ca(2)+ sparks, but not action potential-induced Ca(2)+ signaling in cardiac myocytes. *Cell calcium* 49, 136-143.

Sullivan, J.T., 2018. Reversal of Schistosome Resistance In *Biomphalaria glabrata* By Heat Shock May Be Dependent On Snail Genotype. *Journal of Parasitology* 104, 407-412.

Tennessen, J.A., Bonner, K.M., Bollmann, S.R., Johnston, J.A., Yeh, J.Y., Marine, M., Tavalire, H.F., Bayne, C.J., Blouin, M.S., 2015a. Genome-Wide Scan and Test of Candidate Genes in the Snail *Biomphalaria glabrata* Reveal New Locus Influencing Resistance to *Schistosoma mansoni*. *PLoS neglected tropical diseases* 9, e0004077.

Tennessen, J.A., Théron, A., Marine, M., Yeh, J.-Y., Rognon, A., Blouin, M.S., 2015b. Hyperdiverse Gene Cluster in Snail Host Conveys Resistance to Human Schistosome Parasites. *PLOS Genetics* 11, e1005067.

Thetiot-Laurent, S.A., Boissier, J., Robert, A., Meunier, B., 2013. Schistosomiasis chemotherapy. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 52, 7936-7956.

Thiengo, S.C., Simoes Rde, O., Fernandez, M.A., Maldonado, A., Jr., 2013. *Angiostrongylus cantonensis* and rat lungworm disease in Brazil. *Hawai'i journal of medicine & public health : a journal of Asia Pacific Medicine & Public Health* 72, 18-22.



Tunholi-Alves, V.M., Tunholi, V.M., Garcia, J.S., Costa-Neto, S.F., Maldonado, A.J., Santos, M.A.J., Thiengo, S.C., Pinheiro, J., 2014. Changes in the calcium metabolism of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Journal of helminthology* 88, 160-165.

Tunholi-Alves, V.M., Tunholi, V.M., Pinheiro, J., Thiengo, S.C., 2012. Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata*. *Experimental parasitology* 131, 143-147.

Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., 2016. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *13*, 731-740.

Uotila, L.M., Guenther, C., Savinko, T., Lehti, T.A., Fagerholm, S.C., 2017. Filamin A Regulates Neutrophil Adhesion, Production of Reactive Oxygen Species, and Neutrophil Extracellular Trap Release. *The Journal of Immunology* 199, 3644-3653.

Wang, Q.P., Wu, Z.D., Wei, J., Owen, R.L., Lun, Z.R., 2012. Human *Angiostrongylus cantonensis*: an update. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 31, 389-395.

Wang, T., Van Steendam, K., Dhaenens, M., Vlamincx, J., Deforce, D., Jex, A.R., Gasser, R.B., Geldhof, P., 2013. Proteomic Analysis of the Excretory-Secretory Products from Larval Stages of *Ascaris suum* Reveals High Abundance of Glycosyl Hydrolases. *PLoS neglected tropical diseases* 7, e2467.

WHO 2014. Weekly epidemiologic record (World Health Organization).

WHO, 2016. Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2014. *Releve epidemiologique hebdomadaire* 91, 53-60.

Wu, X.J., Dinguirard, N., Sabat, G., Lui, H.D., Gonzalez, L., Gehring, M., Bickham-Wright, U., Yoshino, T.P., 2017. Proteomic analysis of *Biomphalaria glabrata* plasma proteins with binding affinity to those expressed by early developing larval *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog* 13, e1006081.

Wu, Y., Williams, E.G., Dubuis, S., Mottis, A., Jovaisaite, V., Houten, S.M., Argmann, C.A., Faridi, P., Wolski, W., Kutalik, Z., Zamboni, N., Auwerx, J., Aebersold, R., 2014. Multilayered genetic and omics dissection of mitochondrial activity in a mouse reference population. *Cell* 158, 1415-1430.

Zhang, S.-M., Buddenborg, S.K., Adema, C.M., Sullivan, J.T., Loker, E.S., 2015. Altered Gene Expression in the Schistosome-Transmitting Snail *Biomphalaria glabrata* following Exposure to Niclosamide, the Active Ingredient in the Widely Used Molluscicide Bayluscide. *PLoS neglected tropical diseases* 9, e0004131.

## Anexo 1 – Certificado CEUA



CEUA/UNICAMP

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Análise de proteômica e transcriptômica dos factores que permitem a co-infecção por *Angiostrongylus* sp. e *Schistosoma mansoni* em *Biomphalaria glabrata*", protocolo nº 4024-1, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti / Tiago Manuel Fernandes Mendes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA**, e foi aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de 14 de dezembro de 2015.

Vigência do projeto: 12/2015-03/2019

Espécie/Linhagem: Camundongo heterogênico / Swiss

No. de animais: 245

Idade/Peso: 21 dias / 20g

Sexo: fêmeas

Espécie/Linhagem: Rato heterogênico / Wistar

No. de animais: 72

Peso/Idade: 21 dias / 140g

Sexo: machos

Origem: CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 14 de dezembro de 2015.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva

## Anexo 2 – Certificado curso de experimentação animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Comissão de Ética no Uso de Animais



---

Certificamos que **TIAGO MANUEL FERNANDES MENDES** concluiu o curso online **Legislação e procedimentos para utilização de animais de laboratório**, oferecido pelo Instituto de Biologia da UNICAMP e pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório - CEUA/UNICAMP, obtendo nota **19,00**.

Este certificado tem validade de 02 (dois) anos a partir da data de emissão.

Campinas, 31 de julho de 2017.

*L. Verinaud*

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud

Professor livre-Docente

Presidente da CEUA/UNICAMP

### Anexo 3 – Declaração de direitos Autorais

#### Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Análise proteômica de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* e *Angiostrongylus cantonensis***, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autorai de qualquer editora.

Campinas, 4 de abril de 2019

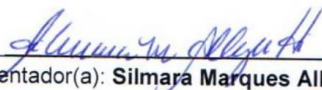
Assinatura :



Nome do(a) autor(a): **Tiago Manuel Fernandes Mendes**

RG n.º g112082-6

Assinatura :



Nome do(a) orientador(a): **Silmara Marques Allegretti**

RG n.º 14282444-6